

Aus der Kinderpoliklinik der Universität München

Direktor (Vorstand): Prof. Dr. med. H. Spiess

ZUR PROBLEMATIK DER IDENTIFIZIERUNG
EINZELNER CHROMOSOMEN DES MENSCHEN
MITTELS DER GIEMSA-BANDENFÄRBUNG

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin

an der Ludwig Maximilians-Universität München

vorgelegt von

Gabriele LOSER

aus

Mannheim

1977

Aus der Kinderpoliklinik der Universität München

Direktor (Vorstand): Prof. Dr. med. H. Spiess

**ZUR PROBLEMATIK DER IDENTIFIZIERUNG
EINZELNER CHROMOSOMEN DES MENSCHEN
MITTELS DER GIEMSA-BANDENFÄRBUNG**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
an der Ludwig Maximilians-Universität München

vorgelegt von

Gabriele LOSER

aus

Mannheim

1977

Mit Genehmigung des Fachbereichs Medizin
der Universität München

Berichterstatter : Prof. Dr. J. D. Murken

Mitberichterstatter : Prof. Dr. H. Spiess

Dekan : Prof. Dr. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung : 5.8.1977



INHALTSANGABE

	Seite
1. Einleitung	1
2. Literaturübersicht	2
2.1 Unterschiede des Eu- und Heterochromatin	2
2.2 Fluoreszenzmethode	6
2.3 Methode nach Caspersen, Zech et aliae	8
2.4 Methode nach Hsu, Patak, Shafer	28
2.5 Methode nach Schnedl	30
2.6 Methode nach Drets und Shaw	32
2.7 Hitze-Denaturierung	41
2.8 Trypsin - Leishman	44
2.9 Methode nach Zakharov und Egolina	45
2.10 Methode nach Shiraishi	66
2.11 Giemsa -9- Färbung	74
2.12 Differenzierung einzelner Chromosomen	77
3. Eigene Untersuchungen	81
4. Kritik der Ergebnisse	82
5. Diskussion	83
6. Literaturverzeichnis	85

1. EINLEITUNG

Die bisherigen Methoden zur Identifizierung einzelner Chromosomen brachten nur eine grobe Einteilungsmöglichkeit und waren zur Beurteilung von Mutationen nur in wenigen Fällen geeignet, wenn sie nämlich zu auffälligen Formveränderungen geführt haben, oder bei Trisomien.

Der erste Hinweis, daß Chromosomen individueller gefärbt werden können, kam aus der Fluoreszenzmikroskopie. (Caspersson 1970) Hier wurde erstmals festgestellt, daß sich Chromosomen nicht gleichmäßig anfärben, sondern Helligkeitsunterschiede in sich selbst erkennen lassen. Nachdem man genaue Überlegungen über die Hintergründe dieses Effektes angestellt hatte, kam man auf den Gedanken, daß es sich unter Umständen um unterschiedliche Reaktionen des Euchromatins und Heterochromatins handeln könne.

Auf diesen Überlegungen baut dann auch die Giemsa-Bandenfärbung auf. Sie verspricht genauere Abgrenzung der färberischen Gebiete als die Fluoreszenzmethode und hat zudem den Vorteil, nicht an das Vorhandensein einer komplizierten Fluoreszenzeinrichtung gebunden zu sein. Außerdem ist Schnedl der Meinung, daß sogar in kontrahierten Chromosomen mehr einzelne Bänder sichtbar seien als bei der Fluoreszenz.

2. LITERATURÜBERSICHT

2.1 UNTERSCHIEDE DES EU- UND HETEROCHROMATIN

Zur grundsätzlichen Theorie der Giemsa-Bandenfärbung wäre zuvor zu bemerken, daß sich ein Chromosom in sich nicht gleichmäßig verhält, sondern daß sich Bezirke erkennen lassen, die eine stärkere Anfärbung erkennen lassen als andere. Nach neueren Untersuchungen färbezeitabhängig.

Man nimmt nun als theoretische Voraussetzung an, daß es sich um unterschiedliches Verhalten des Euchromatins und Heterochromatins handelt.

Euchromatin und Heterochromatin

Betrachtet man zunächst die Struktur des Säugerzellkerns, wie er sich lichtmikroskopisch darbietet, so findet man im Feulgenpräparat dichter gepackte Strukturen in Form von Chromatinbrocken, die man als Heterochromatin bezeichnet hat. Daneben sieht man diffuses oder feinkörniges Chromatin, das man Euchromatin nennt. Extrahiert man z.B. Chromatin von Thymuslymphozyten und unterwirft es einer besonderen Behandlung, so läßt sich zeigen, daß die strukturelle Grundeinheit aus 20-40-A-Febrillen besteht, die ihrerseits 100-200 A dicke Fibrillen aufbauen.

Aus diesen Untersuchungen läßt sich schließen, daß die DNS und das Histon bzw. das chromosomale Protein in einer Hierarchie von Spiralen vorliegt, deren Grundeinheit die 40 A-Fibrille bildet. Man kann sich vorstellen, daß im Interphasezellkern diese Chromatinfäden verschieden stark spiralisiert, d.h. unterschiedlich dicht gepackt vorliegen, so daß daraus die unterschiedliche Strukturdichte des mikroskopisch sichtbaren Chromatins resultiert. Dieses Chromatinmuster von Interphasekernen unterliegt bestimmten Gesetzmäßigkeiten, die sich folgendermaßen kennzeichnen lassen:

1. Innerhalb einer Tierart ist das Chromatinmuster eines Organs relativ konstant, wechselt aber von Organ zu Organ.
2. Nahe verwandte Arten weisen ganz unterschiedliche Chromatinmuster auf.
3. Bei der Stimulierung der Zellkernfunktion wird das dichtgepackte kondensierte Chromatin in lockeres umgewandelt (funktionelle Kernschwellung). Dabei werden die kleinen Zellkerne mit dichtem Chromatin unter Hormoneinfluß in große runde Zellkerne mit lockerem Chromatin umgewandelt. Nach der bisher üblichen Nomenklatur würde dieser Vorgang als "Euchromatisierung" bezeichnet.
4. Der umgekehrte Fall liegt vor, wenn sich z.B. bei der Reifung der weißen oder roten Blutzellen die großen, aus feinkörnigem oder diffusem Chromatin bestehenden Zellkerne der "Blasten" in die kleineren dichten Zellkerne der reifen Granulozyten oder Erythroblasten umwandeln.

Überblickt man diese Situation, so taucht die Frage auf, ob diese verschiedenen Chromatinmuster das morphologische Äquivalent einer verstärkten genetischen Aktivität bzw. Inaktivität darstellen, und welche Anhaltspunkte oder Beweise dafür erbracht werden können. Geht man für so eine Analyse vom licht- oder elektronenmikroskopischen Bild aus, so muß man zunächst rein beschreibend, ohne eine Deutung mit einzubeziehen, feststellen, daß es zwei Arten von Chromatin gibt: kondensiertes (dicht gepacktes), auch heteropyknotisch genanntes Chromatin und nicht kondensiertes (lockeres feingranuläres oder diffus verteiltes), isopyknotisches Chromatin.

Betrachtet man das Chromatin vom Standpunkt des Zytogenetikers, so unterscheidet man 2 Arten:

1. Chromatin von Chromosomenabschnitten, die nach der Mitose im Interphasekern kondensiert bleiben und das als stärker färbbare Chromozentren sichtbar bleibt, wird als Heterochromatin bezeichnet.

2. Andere Chromosomenabschnitte, die im Interphaseken entspiralisiert sind und das feinverteilte aufgelockerte, diffuse Chromatin liefern werden als Euchromatin aufgefaßt. Hinsichtlich der genetischen Aktivität wird vermutet, daß Heterochromatin im Vergleich zum Euchromatin genetisch weitgehend inaktiv sei.

Heterochromatin

Weitere zytogenetische Arbeiten der letzten Jahre haben nun gezeigt, daß die Dinge nicht so einfach liegen. In der zytogenetischen Forschung hat man zur schärferen Fassung des Begriffes Eu- und Heterochromatin noch ein anderes Kriterium herangezogen, nämlich das Replikationsmuster der DNS in der S-Phase (=DNS-Synthesephase). Man hat gefunden, daß das Euchromatin in der frühen S-Phase markiert wird, d.h., daß vorwiegend in der ersten Hälfte der S-Phase ^3H -Thymidin in die DNS des Euchromatins eingebaut wird, während das Heterochromatin in der späten S-Phase seine DNS repliziert. Dieses Verhalten schien zunächst ein sicheres Kriterium darzustellen, bis man herausfand, daß es neben dem kondensierten heteropyknotischen Heterochromatin auch ein isopyknotisches gibt, das zwar spät repliziert, aber wie echtes Euchromatin nicht kondensiert erscheint.

Es ist also daran festzuhalten, daß es vom zytogenetischen Standpunkt zwei Arten von Heterochromatin gibt, die zwar beide spät replizieren, aber hinsichtlich ihrer Morphologie differieren. Sie können heteropyknotisch oder isopyknotisch erscheinen.

Euchromatin

Im Gegensatz zum Heterochromatin läßt sich das Euchromatin vom zytogenetischen Standpunkt her besser definieren; es repliziert in der S-Phase immer früh. Es ist aber keineswegs so, daß das Euchromatin in der Zelle immer als isopyknotisches Material vorliegt. Am Beispiel hormonell stimulierter Zellen kann gezeigt werden, daß das Chromatinmuster deutlich wechseln kann. Unter Hormoneinfluß wird

heteropyknotisches Chromatin isopyknotisch, so daß man in der inaktiven Zelle auch ein heteropyknotisches, also kondensiertes Euchromatin fordern muß, welches frühreplizierend sein muß und das nur potentiell genetisch aktiv ist, d.h. erst auf einen entsprechenden Stimulus hin entspiralisiert bzw. aufgelockert wird und dann genetisch aktiv wird.

Daraus folgt, daß die Begriffe Eu- und Heterochromatin der Zytogenetik nicht mit dem morphologischen Bild des kondensierten bzw. nichtkondensierten Chromatins zur Deckung bringen lassen und daraus wiederum nicht ohne weiteres auf die genetische Aktivität geschlossen werden kann.

Diese Diskrepanzen scheinen sich nun aufzulösen, wenn man dieses Problem aus der Sicht der Biochemie betrachtet. Durch Ultraschallbehandlung von Thymuslymphozyten wurde ein genetisch aktives und ein inaktives Chromatin isoliert, wobei beim aktiven Chromatin eine hohe RNS-Polymeraseaktivität und die Fähigkeit zur Bildung von Messenger-RNS nachgewiesen wurde. Das isolierte aktive Chromatin ist mikroskopisch ein ganz feinfädiges Material, das inaktive Chromatin grobkörnig, was sich auch elektronenmikroskopisch nachweisen läßt. Die Morphologie des isolierten Chromationmaterials entspricht also in etwa den im Zellkern vorliegenden Strukturen. Elektronenmikroskopisch-autoradiographische Untersuchungen haben gezeigt, daß beim Einbau von radioaktivem ^3H -Uridin eine RNS-Synthese praktisch nur im Euchromatin stattfindet. Biochemisch läßt sich zeigen, daß die sogenannte euchromatische Fraktion, gemessen am ^{14}C -Uridintriphosphateinbau, eine hohe RNS-Syntheserate aufweist, während das Heterochromatin eine geringere Aktivität zeigt.

Die quantitative Bausteinanalyse hat weiter gezeigt, daß das aktive Chromatin besonders reichlich Residualprotein, RNS, Phospholipide und Phosphoproteine enthält. Manche Be-

funde (Hyperchromasieeffekt bei Hitze) sprechen dafür, daß die DNS im aktiven Chromatin einsträngig vorliegt. Die Bindung von Hormonen erfolgt bevorzugt an das aktive Chromatin, ebenso die Anlagerung von Actinomycin.

2.2 FLUORESZENZMETHODE

Charakteristische Fluoreszenzbanden wurden von Caspersson u.a. entdeckt, als sie Metaphasechromosomen mit Quinacrine mustard (QM) anfärbten, und sie fanden heraus, daß sich QM verschieden stark an Eu- und Heterochromatin bindet.

Chromosomenregionen, die mit QM stark fluoreszieren, wurden in den menschlichen Metaphasechromosomen 3,13-15, und Y nachgewiesen, während einige andere nur kleine Regionen zeigen, die fluoreszierende Substanzen bevorzugt binden.

Quinacrine mustard wird auf 2 Wegen an die DNS gebunden:

- a) durch eine alkylierende Gruppe, die primär mit dem DNS-Guanin reagiert und
- b) durch Einschaltung der Quinacrine-Gruppe in die Doppelhelix.

So werden die Fluoreszenzbanden als Anhäufung der DNS in verschiedenen Teilen und als qualitativen Unterschied der QM-Bindungskapazität gedeutet.

In Prophasechromosomen zeigt sich eine ungleichmäßige Verteilung der DNS. Wenn die QM-Behandlung in der frühen Metaphase oder gegen Ende der Prophase vorgenommen wird, so zeigen weniger stark kontrahierte pflanzliche und tierische und menschliche Chromosomen. Alle Chromosomen zeigen ein klares Bandenmuster. Die stark fluoreszierenden Regionen treten besonders in der distalen Hälfte des langen Arms des Y-Chromosoms und in einem kleinen Gebiet nahe dem Centromer von Nr. 3 und in einigen Teilen anderer Chromosomen hervor. Die Fluoreszenz ist auch in Interphasenkernen brilliant und bildet ein deutliches Equivalent zur weiblichen Kerngeschlechtsdiagnostik (Y-bodies).

Die Fluoreszenzbanden, die mit QM im menschlichen Blut gefunden wurden, werden durch Unregelmäßigkeiten in der Ausbreitung der DNS bestimmt, die das Chromomerenmuster widerspiegeln, außerdem sind sie auch bei überlagerten Mustern den verschieden starken QM-Bindungen der Chromomerenregion treu.

Determination der Fluoreszenzmuster

Zur Chromosomenidentifizierung ist die Messung mit einem speziellen Fluorometer zeitraubend, und es ist schwierig, Chromosomen, die in derselben Metaphase nahe beieinander liegen, auszumessen. Die fotografische Fluorometrie geht schneller. Zur Identifizierung ist es von zweitrangiger Bedeutung, die Unterschiede in der Fluoreszenzaktivität in absoluten Werten zu ermitteln. Das Hauptziel ist die Lokalisation von Fluoreszenzmaxima und -minima und die Umkehrpunkte der Intensitätskurve festzulegen.

Beobachtungen an menschlichen Blutkulturen

Menschliche Blutkulturen wurden mit QM gefärbt. Die Präparate wurden aus absolutem Alkohol über die Zwischenstufen in Puffer (pH7,0) und dann in Farblösung gebracht. Dazu wurde eine gesättigte wässrige Lösung von Quinacrine mustard Dihydrochlorid in Puffer gegeben, bis eine Konzentration von 50 /ml des Fluorochroms erreicht war. Die Präparate wurden 20 min bei 20°C gefärbt.

Bei Schwesterchromatiden wurde eine gute Übereinstimmung der spaltförmigen Messung gefunden, obwohl der Kontraktionszustand manchmal unterschiedlich war. Außerdem besteht eine ausgezeichnete Übereinstimmung der Messung entlang homologen Chromosomen, die an verschiedenen Stellen der Metaphase liegen. Bei XYY-Männern wurde dieselbe Übereinstimmung bei der Y-Chromosomen gefunden.

In der Mehrzahl der Fälle ist die spaltförmige Messung zur Identifizierung gut geeignet.

2.3 BESTIMMUNG MENSCHLICHER CHROMOSOMEN DURCH DNA-BINDEnde FLUORESZIERENDE STOFFE

T. Caspersson, L. Zech, C. Johansson und
E.J. Modest

Auszug. Die Verteilung von DNA entlang der Metaphasechromosomen, die nicht in außergewöhnlichem Maße zusammengezogen sind, kann mit Hilfe von fluoreszierenden, DNA-bindenden Stoffen im Fluoreszenzmikroskop sichtbar gemacht werden. Weitere charakteristische Einzelheiten in den Fluoreszenzstrukturen erhält man mit Fluorochromen, die sich vorzugsweise an bestimmte Chromosomenregionen binden. Die stark fluoreszierende, alkylierende Agens QM (quinacrine mustard = spezielle Art von Senföl) bewirkt eine diskrete Fluoreszenzklassifizierung sowohl von pflanzlichen als auch von Säugetier-Metaphase-Chromosomen, wahrscheinlich durch selektive Bindung an Guanin-Rückstände in DNA, und ist außerdem fähig, sich in die Doppelspindel von DNA einzuschieben. Chromosomenregionen, die bei QM besonders stark fluoreszieren, sind in den menschlichen Metaphase-Chromosomen 3, 13 - 15 und Y dargestellt worden.

Für den schnellen und genauen Nachweis von Fluoreszenzstrukturen in menschlichen Metaphase-Chromosomen ist eine geeignete Meßtechnik entwickelt worden. Die fotoelektrischen Aufzeichnungen der Fluoreszenzstrukturen (oder Muster) sind weitaus detaillierter, als durch das menschliche Auge erkennbar ist. Die beschriebenen Fluoreszenzstrukturen bzw. Muster basieren auf der Messung von etwa 1000 menschlichen Metaphase-Chromosomen. Diese neuartige Technik, Fluoreszenzstrukturen in menschlichen Chromosomen zu bestimmen, dürfte besonders wertvoll sein für die Identifizierung der Chromosomen 4 bis 5 und der einzelnen Typen in der Gruppe 6 bis 12. Individuelle typische Strukturen kommen auch innerhalb der Gruppen 13 bis 15, 17 bis 18 und 21 bis 22 vor.

Einführung. Charakteristische fluoreszierende Strukturen werden von QM in den Metaphase-Chromosomen von *Vicia faba*, *Trillium erectum*, *Scilla sibirica* und gewissen anderen Pflanzen produziert, weil QM sich mit unterschiedlicher Intensität an heterochromatische und euchromatische Regionen bindet (Caspersson, Farber, Foley, Kudynowski, Modest, Simonsson, Wagh and Zech, 1968; Caspersson, Zech, Modest, Foley, Wagh and Simonsson, 1969 a and b). Vergleiche der DNA-Verteilung, die mit Hilfe eines speziell konstruierten UV-Mikrospektrographen mit hoher Auflösung festgestellt wurde (Carlson, Caspersson, Foley, Kudynowski, Lomakka, Simonsson and Sörén, 1963), sowie die Fluoreszenzintensität in den verschiedenen Chromosomenteilen, welche mit einem Spezialfluorometer mit hoher Auflösung gemessen wurde (Caspersson, Zech, Modest, Foley, Wagh and Simonsson, 1969: a) zeigen, daß das Verhältnis der Fluoreszenzintensität pro DNA-Einheit zwischen heterochromatischen und euchromatischen Chromosomenregionen von 1,5 bis 2,5 variiert.

Chromosomenregionen, die mit QM stark fluoreszieren, sind in menschlichen Metaphase-Chromosomen 3, 13,- 15 und Y dargestellt worden (Caspersson, Zech and Johansson, 1970), während einige der anderen menschlichen Chromosomen auch kleine Regionen zu zeigen scheinen, welche vorzugsweise fluoreszierende Substanz binden.

Ähnliche Beobachtungen wurden in pflanzlichen Chromosomen mit anderen DNA-bindenden fluoreszierenden Substanzen gemacht, besonders mit solchen, die sich in die Doppelspindel einschieben (Caspersson, Zech, Modest, Foley, Wagh and Simonsson, 1969: a, b). Die Muster, welche man mit QM erhält, sind jedoch viel klarer als diejenigen, welche mit den anderen untersuchten Fluorochromen erreicht werden.

DETERMINANTE DER QM-VERTEILUNG IN METAPHASE-CHROMOSOMEN

QM bindet sich auf zwei verschiedene Arten an DNA:

- a) durch die alkylierende Gruppe, welche primär mit DNA-Guanin reagiert (Caspersson, Farber, Foley, Kudynowsky, Modest, Simonsson, Wagh and Zech, 1968) und ergibt das Bild, auf das sich oben bezogen wurde, und
- b) durch Einschieben der "Quinacrine"-Gruppe in die Doppelspindel. Auf diese Weise wird die Fluoreszenzstruktur bzw. das Muster in einem Chromosom, welches mit QM behandelt wurde, sowohl durch die Menge von DNA in den verschiedenen Teilen des Chromosoms bestimmt werden, als auch durch die qualitativen Unterschiede in der QM-bindenden Kapazität des DNA in verschiedenen Chromosomen-Regionen. Die zuletzt aufgeführten Variationen werden sichtbar als besonders stark fluoreszierende Bänder oder Gebiete in gewissen Regionen des Chromosoms.

In großen, hochkonzentrierten Pflanzenchromosomen - zum Beispiel in *Vicia* - ist die Verteilung von DNA entlang des Chromosoms auffallend einheitlich (Caspersson, Farber, Foley, Kudynowski, Modest, Simonsson, Wagh and Zech, 1968; Caspersson, Zech, Modest, Foley, Wagh, Simonsson, 1969; a). In Prophase-Chromosomen jedoch bewirkt die chromomere Struktur eine uneinheitlichere Verteilung von DNA. Zusammengezogene Metaphase-Chromosomen von Roggen zeigen ein grobes Muster von Primär- und Sekundärverengungen, wodurch die Verteilung von DNA widerspiegelt wird (gemessen mit schreibendem UV-Mikrospektrophotometer; cf. Heneen et.al., under publ.). Ähnliche Beobachtungen wurden in den Metaphase-Chromosomen von chinesischen Hamstern gemacht (Caspersson et.al., under publ.).

Wenn die Behandlung mit QM im frühen Stadium der Metaphase oder zum Ende der Prophase hin durchgeführt wird, zeigen weniger stark zusammengezogene pflanzliche und tierische Chromosomen (einschließlich menschlicher Proben) ein zu-

sätzliches feines Fluoreszenzmuster. Alle Chromosomen zeigen ein klares Bandmuster, mit bestimmten zusätzlichen Regionen von starker Fluoreszenz. Die zuletzt erwähnten fluoreszierenden Regionen sind besonders stark ausgebildet in der distalen Hälfte des langen Armes des Y-Chromosoms und in einem kleinen Gebiet nahe dem Zentromer im Chromosom 3, als auch in gewissen Teilen anderer Chromosome. Die Verteilung von DNA in Chromosomen 1 - 3, die durch UV-Ultramikrospektrophotometrie mit hoher Auflösung reproduziert wurde, scheint in diesen frühen Stadien der Zusammenziehung unregelmäßig zu sein und entspricht etwa dem chromomeren Muster. Ein chromomeres Muster in menschlichen Chromosomen ist von Schultz und St. Lawrence (1949) und von Yerganian (1957) dargestellt worden.

Die Fluoreszenzstruktur, die man in menschlichen Proben mit QM erhält, wird bestimmt durch Unregelmäßigkeiten in der Verteilung von DNA, wobei das chromomere Muster widergespiegelt wird und außerdem durch ein überlagertes Muster, welches zurückzuführen ist auf besonders starke QM-Bindung in bestimmten Chromosomenregionen. Andere DNA-bindende fluoreszierende Substanzen rufen ähnliche Muster hervor, aber keines dieser Agenzen erreicht die Klarheit, Stabilität und Wiedergabefähigkeit des Fluoreszenzmusters, welches mit QM erreicht wird.

BESTIMMUNG DER FLUORESZENZSTRUKTUREN BZW. MUSTER

Das Spezialfluorometer bewirkt eine genügend starke Auflösung, so daß individuelle Einzelheiten der Chromosomen gemessen werden können. Messungen an den Chromosomen 1 - 3 sind in Abbildung 3 wiedergegeben, in welcher die Ordinate die Fluoreszenzintensität absolut pro Einheit der Chromosomenlänge darstellt. Zum Zwecke der Identifizierung ist diese Technik jedoch verhältnismäßig zeitraubend, außerdem ist ihre Verwendung schwierig für das Messen vieler Chromosomen dicht beieinander in derselben Metaphase-Platte, ohne daß Fluoreszenz verlorengeht durch übermäßiges Strahlen der Probe.

Ein schnelleres Verfahren stellt die fotografische Fluorometrie dar. Zum Zwecke der Identifizierung ist es nur von zweitrangiger Wichtigkeit, die Beziehungen zwischen der Fluoreszenzintensität in verschiedenen Teilen eines Chromosoms absolut zu bestimmen. Das primäre Ziel ist es, die Stellen der maximalen und minimalen Fluoreszenz zu bestimmen sowie Biegungspunkte auf den Intensitätskurven. Man erhält solche Informationen leichter durch direktes Messen auf Fotodrucken von einem Negativ aus dem Fluoreszenzmikroskop. Serienmäßige Messungen lassen sich viel leichter auf einem Druck als auf einem Negativ durchführen.

Abbildung 4 zeigt das Reflektionsphotometer, welches konstruiert worden ist. Abbildung 5 zeigt das Instrument selbst. Das Kopierwerk - Vergrößerung ist in der Regel 2500-fach - wird am Objektträger des Mikroskops angebracht und gleichmäßig durch zwei Lampen illuminiert. Das Objekt wird auf ein Fotozellensystem projiziert, welches vorne eine Öffnung hat, entweder in Form eines Schlitzes (welcher, wenn auf das Objekt reprojiziert wird, einem Rechteck entspricht mit den Maßen $0,3 \mu\text{m} \times 4 \mu\text{m}$) oder einem Punkt (mit einem Durchmesser von $0,3 \mu\text{m}$). Unter dauernder visueller Kontrolle von einem seitlich angebrachten Kieker aus wird das Objekt (Chromosomen-Präparat) so eingeführt, daß die schlitzförmige Öffnung mit seiner Breitseite über die Länge des Chromosoms streicht (Schlitzmaß). Als Alternative kann die runde Öffnung, ebenfalls unter visueller Kontrolle, entlang der Mittellinie eines Chromatids (Chromatid-Maß) entlanggeführt werden. Die Bewegung des Objektträgers ist mechanisch gekoppelt an ein Potentiometer, welches als Eingabe für die X-Bewegung in einem XY-Aufzeichner dient, wobei die Intensität des reflektierten Lichtes entlang der Y-Achse aufgezeichnet wird. Das Diagramm zeichnet dann die Verteilung der Fluoreszenzintensität entlang dem Chromosom auf. Die Vergrößerung entlang der X-Achse ist einstellbar, wobei die allgemein verwendete Vergrößerung diejenige ist, in welcher ein um auf der Chromosomprobe

25 mm auf dem Diagramm entspricht. Die Verstärkung des Fotostroms ist ebenfalls einstellbar, und zwar innerhalb eines verhältnismäßig großen Spielraumes. Die Einstellung sollte so gewählt werden, daß in jedem einzelnen Fall die Aufzeichnung entlang der Y-Achse lesbar ist. Daraus folgt, daß die Skala der absoluten Intensität nicht in jedem Verteilungsdiagramm die gleiche ist. Die beiden Vermessungsarten - Schlitz- und Chromatid-Messung - wurden wegen der an bestimmten Chromosomen festgestellten Zusammenziehungen gewählt. Ein vollständigeres Bild der Fluoreszenzverhältnisse wird dann erreicht, wenn beide Vermessungsarten durchgeführt werden.

Die Vergrößerung im Mikroskop und die Öffnungsgrößen wurden gewählt mit Bezug auf die erreichbare mikroskopische Auflösung. Der Planapochromat von Zeiss, 1,30 num. ap. 100fach, wurde ausgewählt, weil er von verschiedenen Typen und Ausführungen das beste Objektiv hat. Es wird darauf hingewiesen, daß die Fluoreszenztechnik mit "selbstleuchtenden Objekten" etwa die doppelte Auflösung erlaubt, wie mit dem gleichen Objekt bei konventioneller Mikroskopie. Die Auflösungsgrenze beträgt sowohl theoretisch als auch in der Praxis 0,3 μ m. Bei den Fluoreszenzaufzeichnungen in Abbildung 6 und in allen folgenden Diagrammen stellen die Werte entlang der Y-Achse keine lineare Funktion der Intensität dar; dieses Verhältnis wird beeinflußt von zwei fotografischen Vorgängen, die bei der Herstellung des Bildes mitspielen. Trotzdem werden die Stellen der Maxima und Minima sowie die Stellen der Biegungen ziemlich genau auf der Intensitätskurve angezeigt. Darüber hinaus weicht die Intensitätsskala nicht wesentlich von einem Linearverhältnis ab, wie man feststellen kann, wenn man die direkt auf den Chromosomen gemessenen Fluoreszenzintensitäten (Abbildung 3) mit denjenigen vergleicht, die auf den Fotografien festgehalten wurden (Abbildung 9).

BEOBACHTUNGEN AN MENSCHLICHEN PROBEN

Material: Es wurde ein Verfahren angewandt, bei dem periphere Blutkulturen verwendet wurden, und die Proben wurden im wesentlichen nach der Methode von Moorhead, Nowell, Mellman, Battips and Hungerford, 1960, präpariert.

Das Färben: Hier wird lediglich die Methode mit QM beschrieben, da sie sich als wesentlich überlegen gegenüber denjenigen Methoden erwies, bei denen mit anderen fluoreszierenden DNS-bindenden Substanzen gefärbt wurde. Färbeverfahren mit einer Reihe von anderen Fluorochromen wurden an anderer Stelle beschrieben (Caspersson, Zech, Modest, Foley, Wagh and Simonsson, 1969 a and b).

Die Behandlung mit QM wurde in der folgenden Weise durchgeführt: Die Glasbilder wurden aus absolutem Ethanol durch Alkohol und Pufferlösung (MacIlvaines Dinatriumphosphat/Zitronensäure-Puffer, pH 7,0) in die Färbelösung gebracht. Ein Aliquot QM-Dihydrochlorid in wässriger Lösung wurde der Pufferlösung beigegeben, so daß eine endgültige Konzentration von 50 ug/ml Fluorochromen in der Färbelösung erreicht wurde. Nach dem Färben während einer Zeit von 20 Minuten bei 20° Celsius wurden die Glasbilder dreimal in Pufferlösung gewaschen und dann in Pufferlösung durch ein letztes Eintauchen versiegelt.

MESSUNGEN DER FLUORESZENZ

Die Färbung mit QM ist verhältnismäßig widerstandsfähig gegen Bestrahlung. Es wurden Versuche durchgeführt, mit dem Fluoreszenzmikroskop gute Fotografien bei einer Belichtungszeit von 20 Sekunden herzustellen. Das Chromosomen-Objekt wurde auf eine Fotozelle projiziert, und bei dauernder Bestrahlung mit einer konstanten Stärke wurde die Abnahme an Intensität gemessen. Die erste bemerkenswerte Abnahme er-

folgte nach etwa zwei Minuten. Nach vier Minuten hatte die Intensität um 50% abgenommen, und nach zwölf Minuten war sie auf 25% herabgesunken; die anschließende Abnahme erfolgte allmählich.

Die Fotografien wurden mit einem Fluoreszenzmikroskop von Zeiss hergestellt mit einer Quecksilberlampe HBO 200 W und mit der folgenden Kombination von Filtern: BE 3 (2,5 mm) und OG 1 (1,5 mm). Ein Epiverdichter wurde verwendet zusammen mit einem dichroitischen Reflektor (begrenzende Wellenlänge ca. 480 nm). Ein Abtrennfilter für Kurzwellen (begrenzende Wellenlänge ca. 500 nm) wurde zur Unterdrückung im Fluoreszenzstrahl verwendet.

Die Negative wurden mit Kodak Tri-X hergestellt und die Abzüge mit Agfa-Gevaert Brovira.

Die mit dem XY-Schreiber erhaltenen Werte wurden mit Ausziehtusche eingesetzt, damit sie sich grafisch reproduzieren ließen. Mit der in Abbildung 6 und den folgenden Abbildungen verwandten Skala beträgt die Auflösung (entsprechend 0,3 μ m) 2,5 mm und die lineare Vergrößerung entlang der X-Achse verhält sich so, daß ein um 4 mm entsprechen.

ALLGEMEINE RESULTATE

Wir fanden eine gute Übereinstimmung der Daten zwischen Chromatid-Messungen entlang der einzelnen Schwesterchromatiden (Abb. 6), obwohl der Grad der Zusammenziehung manchmal variiert (Abb. 6c).

Es besteht außerdem eine ausgezeichnete Übereinstimmung zwischen den Messungen mit der schlitzförmigen Blende entlang homologen Chromosomen, die sich in verschiedenen Teilen der Metaphase-Platte befinden (Abb. 7). In männlichen

XYX wurde die gleiche Übereinstimmung zwischen den Messungen mit der schlitzförmigen Blende entlang den beiden Y-Chromosomen festgestellt (Caspersson, Kjessler and Zech, under publ.).

Zum Zwecke der Identifizierung sind in den meisten Fällen Messungen mit der schlitzförmigen Blende am geeignetsten. Der Wert der Chromatid-Messungen in einzelnen Fällen wird durch die beiden Arten der Messungen im Chromosom 3 dargestellt, die in Abbildung 8a reproduziert sind. Das Chromosom 3 zeigt eine kleine Region sehr intensiver Fluoreszenz in der Nähe des Zentromers, wo das Chromosom beträchtlich enger ist als entlang seiner Arme. Dadurch hebt sich diese Region bei Chromatidmessungen viel stärker ab, als in Messungen mit der schlitzförmigen Linse. Analoge Resultate für zwei Chromosomen der 13 - 14-Gruppe sind in den Abbildungen 8 b und c wiedergegeben.

Die Diagramme in Abbildung 9 basieren auf den Messungen von etwa 1000 Chromosomen, die aus der Metaphase-Platte von vier Männern stammen. Über jeder Kurvengruppe ist das Diagramm für ein Chromosom von durchschnittlicher Zusammenziehung gezeigt - entsprechend dem Durchschnitt aller Chromosomen jenes Typs, die bis heute gemessen wurden. Unter diesem typischen Beispiel werden Diagramme für Chromosomen gezeigt, die willkürlich aus anderen Metaphase-Platten herausgewählt wurden, um die Übereinstimmung des Musters bzw. der Struktur zu erhellen. Es wurde der Versuch gemacht, Chromosomen mit verschiedenen Graden der Zusammenziehung mit einzubeziehen, wobei das am wenigsten zusammengezogene (in welchem das Muster am klarsten zu erkennen ist) ziemlich weit oben gezeigt wird und die stärker zusammengezogenen weiter untern. Wie die Diagramme zeigen, gibt es eine gute Übereinstimmung zwischen den Chromosomen jedes Typs.

Zusätzlich zu den Messungen, die in Abbildung 9 dargestellt sind, wurden seither weitere Analysen an vielen Chromosomen von Frauen gemacht. Bis heute zeigen die Ergebnisse eine gute Übereinstimmung mit den typischen Kurven, die in Abbildung 9 gezeigt sind. Es werden jedoch weitere Beobachtungen durchgeführt, besonders mit Chromosomen der Gruppen 13 - 15 und 17 - 18. Detailliertere Strukturen von schwach zusammengezogenen Chromosomen werden besonders dafür benötigt, um die Chromosomen-Aberrationen - das heißt örtliche Veränderungen oder Ausfälle - zu studieren.

Kommentare zu gewissen Chromosomen-Typen in Abbildung 9

Die Chromosomen 1 und 2 zeigen typische Strukturen. Die Tendenz dieser langen Chromosomen, in gekrümmter oder gebogener Stellung zu liegen, stellt manchmal bei Messungen mit schlitzförmiger Blende eine kleinere Komplikation dar, dies ist aber kaum der Fall bei Chromatid-Messungen.

Chromosom 3 zeigt eine intensiv fluoreszierende Region in der Nähe des Zentromers (Caspersson, Zech und Johansson, 1970, in der Fachpresse).

Die erhaltenen Strukturen bzw. Muster für die Chromosomen 4 und 5 sind einheitlich und charakteristisch.

Die C-Gruppe enthält sechs klar voneinander unterschiedene Typen sowie einen siebten Typ, welcher noch etwas verschwommen ist, da er einem der anderen sechs sehr ähnlich ist. Diese Typen sind so charakteristisch, daß Fluoreszenz-Messungen ganz sicher eine wertvolle Hilfe sein können für Identifikationszwecke in dieser Gruppe. Für diese Chromosomen ist die Meßtechnik mit geschlitzter Blende die beste.

Die Chromosomen in der D-Gruppe scheinen drei Mustertypen zu bilden, aber hier sind weitere Beobachtungen erforderlich. Der kurze Arm zeigt sehr oft eine kleine Region von äußerst intensiver Fluoreszenz, die sich besonders bei Chromatid-Messungen zeigt. Diese Region neigt dazu, sich von Probe zu Probe unterschiedlich darzustellen, aber es ist noch zu früh, zu entscheiden, ob diese Unstetigkeit auf die Vorbereitungsart zurückzuführen ist oder auf eine tatsächliche physiologische - möglicherweise funktionelle - Unterschiedlichkeit.

In der Gruppe E ist das Muster für das Chromosom 16 vollständig charakteristisch.

Die Ergebnisse für die Chromosomen 17 bis 18 decken sich mit denjenigen für die Chromosomen 13 bis 15. Es gibt starke Anzeichen für zwei verschiedene Typen, aber weitere Studien sind erforderlich.

Bis heute wurden in den Mustern für die Chromosomen 19 und 20 keine klaren Charakteristiken gefunden.

In der G-Gruppe zeigen die Chromosomen 21 und 22 deutlich unterschiedene Typen.

Das Y-Chromosom hat ein besonders charakteristisches Muster mit extrem intensiver Fluoreszenz in der Distalhälfte des langen Armes. Die Fluoreszenz pro DNA-Einheit beträgt mehr als das Doppelte der durchschnittlichen Fluoreszenz der größten Chromosomen bei direkten Messungen (Caspersson, Zech und Johansson, 1970). Dies geht nicht sehr klar aus den hier gezeigten Diagrammen hervor, da die Intensitätsachse während der Aufzeichnung gesetzt wurde, um eine deutliche Anzeige ohne Rücksicht auf die absolute Intensität zu geben. In der Fotografie Abbildung 1 b ist diese bemerkenswerte intensive Fluoreszenz des Y-Chromosoms leicht erkennbar.

Der Wert der Fluoreszenzstruktur bzw. des Fluoreszenzmusters für visuelle Identifikation

Die bis heute gemachten Untersuchungen zeigen, daß die QM-Technik für gewisse Arten der visuellen Identifikation von gewissem Wert sein kann, besonders in der Gruppe 6 bis 12.

Ihr Wert für die direkte visuelle Arbeit ist nichtsdestoweniger durch zwei Faktoren stark begrenzt. Der erste Faktor ist einfach die Schwierigkeit, die Vielfalt der Muster bzw. Strukturen in Erinnerung zu behalten. Das zweite, schwierigere Hindernis ist, daß die Übergänge zwischen starken und schwachen Bändern der Fluoreszenz in den Chromosomen nicht immer klar vorgezeichnet sind. Während das menschliche Auge äußerst sensitiv ist gegenüber deutlichen Intensitätsgrenzen, ist es physiologisch zu schwach ausgerüstet, um Differenzen in der Intensität zu registrieren, wenn der Übergang allmählich verläuft. Daraus ergibt sich, daß das Auge ganz einfach unfähig ist, viele der Einzelheiten zu entdecken, welche deutlich und kräftig in den aufgezeichneten Mustern herauskommen.

Abb. 1 a und b

Menschliche Chromosome, die mit QM gefärbt wurden. Vergrößerung: 2500-fach. In Abbildung a sind die Chromosomen weniger zusammengezogen und zeigen deutlich das feine Muster (bzw. die feine Struktur) sowie stark fluoreszierende Regionen in den Chromosomen 3 und Y. In Abbildung b zeigen die stärker zusammengezogenen Chromosomen immer noch ein Muster. Besonders starke Fluoreszenz ist in der distalen Hälfte des langen Armes des Y zu erkennen sowie in den kurzen Armen von Chromosomen der D-Gruppe.

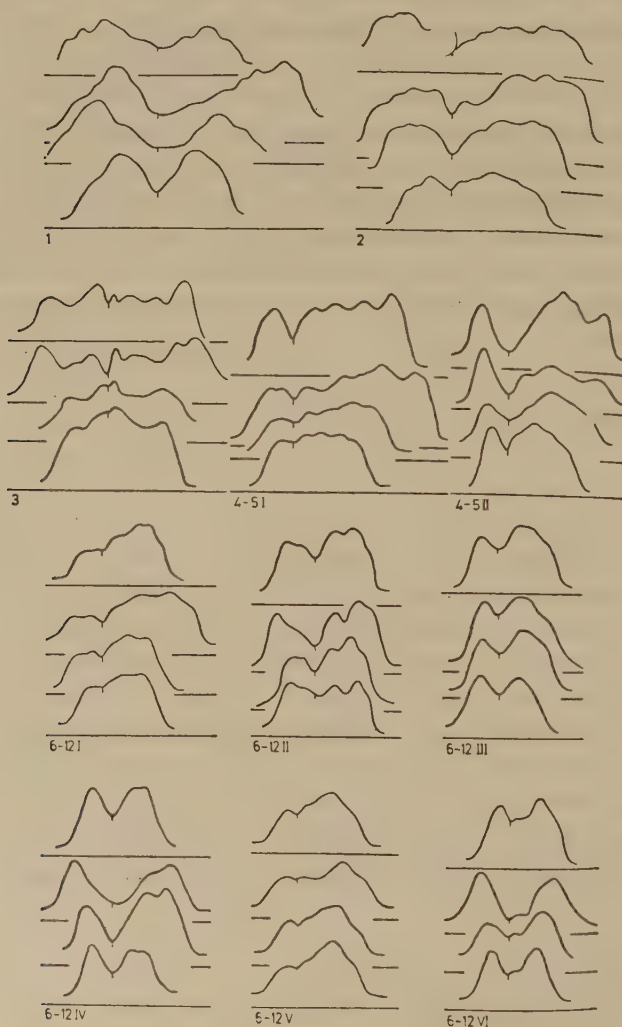


Abbildung 2 a bis c

Verteilung von DNA entlang der Chromosomen 1 (a), 2 (b) und 3 (c), gemessen mit dem UV-Mikrospektrophotometer. Die Schußweiten liegen 0.2 um voneinander entfernt.

Abbildung 3 a bis c

Fluoreszenz-Verteilungskurven direkt gemessen an den Chromosomen 1 (a), 2 (b) und 3 (c). Die absolute Intensität ist zur Y-Achse eingetragen und die Entfernung entlang dem Chromosom gegen die X-Achse.

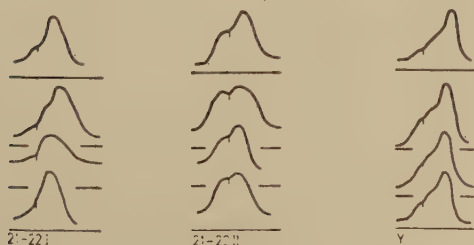
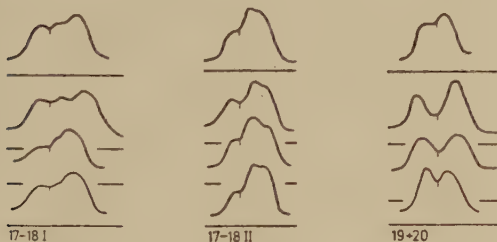
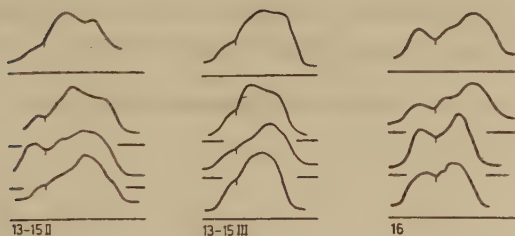
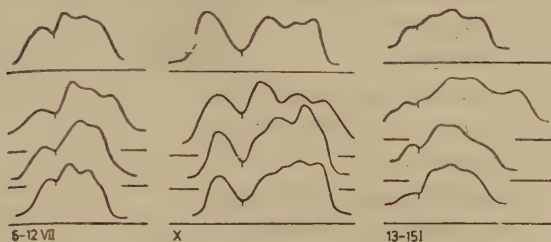


Abbildung 4 Allgemeiner Aufbau des Reflexions-Photometers
(Einzelheiten sind im Text dargelegt)

photo multipller	= Photo-Vervielfacher
amplifier	= Verstärker
zero and gain adjustment	= Null- und Verstärkungseinstellung
Y-input	= Y-Einleitung
X-input	= X-Einleitung
XY-recorder	= XY-Aufzeichner
field lens	= Feldlinse
ocular	= Okular
diaphragm or slit	= Blende oder Schlitz
beam splitter	= Strahlzerleger
objective	= Objektiv
epi illumination	= Auflichtbeleuchtung
object (print)	= Objekt (Photoabzug)
handoperated micro- scope stage	= handbetätigter Mikroskop-Objekttisch
helical potentiometer	= schraubenartiges Potentiometer
zero and gain adjust- ment	= Null- und Verstärkungseinstellung

Abb. 4

Das Reflexions-Photometer

220

T. Caspersson, L. Zech, C. Johansson and E. J. Modest:

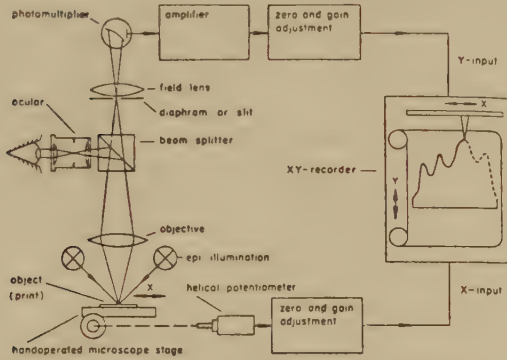


Fig. 4. General design of the reflection photometer (for details see text)

Abb. 5

Chromatid-Messungen in Schwester-Chromatiden.
Es zeigt sich eine gute Übereinstimmung, obwohl der Grad der Zusammenziehung etwas variieren mag (5c). Das Zentromer ist mit einer kurzen vertikalen Linie markiert.

222

T. Caspersson, L. Zech,

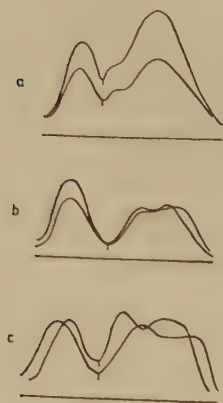


Fig. 5 a-c

Abb. 6

Messungen mit schlitzförmiger Blende an homologen Chromosomen aus derselben Metaphase-Platte. Sie zeigen eine gute Übereinstimmung der Muster. Die Intensitätsskala wurde willkürlich ausgewählt (siehe Text).

C. Johansson and E. J. Modest:

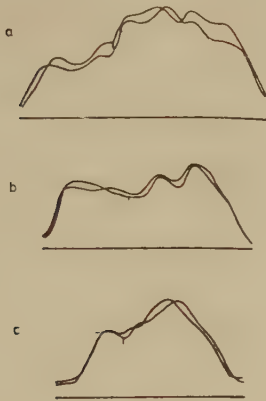


Fig. 6 a-c

Abb. 7 a - c

Messungen mit schlitzförmiger Blende (geschlossene Linse) im Vergleich mit Chromatid-Messungen (punktierte Linie) in Chromosomen mit kleinen Gebieten von besonders starker Fluoreszenz.

a = Chromosom 3; b und c = Chromosomen aus der D-Gruppe.

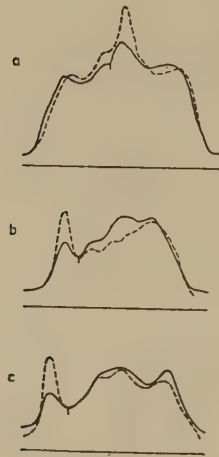


Fig. 7 a - c

Wir erhielten durch Messungen mit der schlitzförmigen Blende Fluoreszenzdiagramme von allen menschlichen Chromosomen. Die oberste Kurve in jeder Gruppe (die ein mäßig zusammengezogenes Chromosom von einer gut gefärbten Platte darstellt) dient als Beispiel für den Typ.

Die Kurven darunter zeigen die Übereinstimmung zwischen Chromosomen von verschiedenen Metaphaseplatten und in verschiedenem Grad der Zusammenziehung. Sie ähneln den Kurvenscharen auf den Seiten 20 und 21.

2.4 METHODE NACH HSU, PATAK, SHAFER

Hsu, Patak und Shafer berichten über die Induktion von Chromosomen-Crossbanding, indem sie die Zellen vor der Fixation mit Chemikalien behandeln. In den letzten Jahren wurden verschiedene Methoden, auf Metaphasechromosomen Banden zu erzeugen, entwickelt. Dabei wurden vier verschiedene Möglichkeiten, nämlich Q, C, G und R-Banden erkannt. All diese Methoden setzen nach der Fixation ein.

Ausgestreckte oder segmentierte Chromosomen wurden schon vor Einführung der neuen Technik gelegentlich gefunden. Z.B. fanden Darlington und La Cour ungefärbte Segmente der Metaphasechromosomen nach Kältebehandlung. Arrhigi und Hsu fanden, daß die Behandlung der Zellen des chinesischen Hamsters mit Aktinomycin im Kulturmedium stark gestreckte Metaphasechromosomen ergab. Stubblefield erhielt "segmentierte" Chromosomen durch prolongierte Colcemid-Behandlung wachsender Zellkulturen des chinesischen Hamsters. Die Morphologie seiner Chromosomenabbildungen können als vergrößerte G-Banden betrachtet werden.

Shafer induzierte G-Banden, indem er Aktinomycin (AMD) einige Stunden vor der Ernte den menschlichen Lymphocytenkulturen hinzufügte. Die Objektträger wurden nach Lufttrocknung ohne zusätzliche Behandlung direkt mit Giemsa gefärbt.

Seit es bekannt ist, daß sich AMD an die DNS bindet, testeten sie eine Anzahl zusätzlicher Verbindungen mit gleichen Eigenschaften, indem sie sowohl Fibroblasten des chinesischen Hamsters, als auch menschliche Lymphocytenkulturen verwendeten. Folgende Verbindungen wurden studiert: AMD, Ethidiumbromid (EB) Daunomycin, Nogalomycin, Qinacrine-Dehydrochlorid, Azur-B, Cytosan und eine Kombination aus AMD und EB. Diese Zusätze wurden einige Stunden vor der Ernte zugegeben (2-4 h bei Hamsterzellen, 4-6 h bei menschlichen Zellen).

Nach dem Mitosestopp mit Colcemid (2-4 h) wurden die Zellen mit hypotoner Lösung behandelt, mit Carnoy's Fixation (Methanol 3:1 Eisessig) fixiert und auf sauberen Objektträgern luftgetrocknet. Diese werden ohne weitere Behandlung mit Giemsa gefärbt.

Alle Mittel dieser Studie, mit Ausnahme von Qina-crine-Dihydrochlorid, sind in der Lage, Chromosomenbanden zu erzeugen, wenn sie dem Kulturmedium nur einige Stunden zugefügt werden. Möglicherweise ist Azur-B am interessantesten, ein Zusatz zur Giemsa-Farbmischung, das ebenso bei chinesischen Hamsterzellchromosomen Banden erzeugt.

Obwohl die Bandenanalysen noch in der Entwicklung sind, steht es fest, daß die Bandenmuster, die durch verschiedene Mittel hervorgerufen werden, nicht die gleichen sind. Shafer demonstriert G-Banden, die durch Behandlung mit AMD hervorgerufen werden. Ihre Daten zeigen, daß das Bandenmuster, das durch Ethiumbromid hervorgerufen wird, den G- oder R-Banden entgegengesetzt zu sein scheint. Caspersson u.a. zeigten, daß EB bei Chromosomen der Pflanze *Scilla sibirica* ein entgegengesetztes Fluoreszenzmuster erzeugt wie Quinachrinemustard. Die Kombination von AMD und EB zielt auf Folgendes: die meisten Chromosomen sind extensiv gestreckt, wenn AMD und EB die gleichen Banden erzielen, so gibt die Kombination beider keinen synergistischen Effekt.

Die erste Gruppe der G-Bandenbehandlung war eine Ausweitung oder Modifikation der Heterochromatinbehandlung. Deshalb war es ziemlich natürlich, daß Forscher, die voraussetzten, daß die erhaltenen G-Banden Bündel der repetitierenden DNS sind, die unter Experimentalbedingungen denturierten und renaturierten. Jedoch zeigten spätere Experimente, daß G-Banden durch Mittel hervorgerufen werden können, die die DNS nicht angreifen, z.B. Trypsin. Chromosomales Protein wird in Moleküle mit einbezogen, die verantwortlich für G-Banden sind.

Der Aktionsmodus einzelner dieser Mittel ist gut bekannt und es ist durchaus möglich, daß diese Mittel sich an die chromosomale DNS binden, spezifisch während der G-2-Phase (2-4 h vor der Mitose), auf diese Weise mit der Bindung verschiedener chromosomaler Proteine interferierend, die für das Kondensieren der Chromosomen bei ihrer Vorbereitung zur Mitose notwendig sind. Obwohl unsere Daten im augenblicklichen Stand keine Interpretation zulassen, daß die verschiedenen Typen der induzierten Banden (ähnlich den G- und R-Banden), keine verschiedenen Reflexionen über die verschiedenen Behandlungsarten zulassen, so bedeuten sie doch, daß das Protein-DNS-Verhältnis bedeutend ist und nicht das Protein alleine, das für die G- und R-Typen der Banden ausschlaggebend ist. Es ist durchaus möglich, daß Bandenmuster, die weder den R- oder G-Banden entsprechen zu tage kommen werden.

Diese Behandlung vor der Fixation, um Chromosomen-Banden zu induzieren bietet einen anderen Blickwinkel zur Annäherung an die molekulare Chromosomenstruktur. Diese Banden würden also eine ultrastrukturelle Analyse erlauben ohne die technischen Probleme der Behandlung nach der Fixation für die Elektronenmikroskopie.

2.5 METHODE NACH SCHNEDL

Schnedl entdeckte als erster bei seinen Studien über die Quinacrine-Fluoreszenz eine sehr ähnliche Methode.

Von Blutkulturen gesunder männlicher und weiblicher Individuen werden Chromosomenpräparate hergestellt, die nach der herkömmlichen Methode luftgetrocknet werden. Anschließend werden die Chromosomen für 90 sec in 0,07n NaOH gebracht, mehrmals mit 70% Äthanol gespült, dann in 95% und hinterher in absoluten Äthanol gebracht und getrocknet. Dann werden die Präparate auf den Objektträgern für 24 Std in Sörensenpuffer ($0,15\text{m KH}_2\text{PO}_4 / \text{Na}_2\text{HPO}_4$) bei pH 6,8 und 59 C, wieder getrocknet und mit Giemsa-Lösung (Merck) bei pH 7,0 gefärbt.

Derart behandelte Metaphasechromosomen prägen einige morphologische Besonderheiten aus. Schnedl konnte viel dunkel gefärbte Gebiete hellere Zonen auf der ganzen Länge eines Chromatids identifizieren, die insgesamt ein klares Bandenmuster bildeten, daß für jedes einzelne Chromosomenpaar charakteristisch war. Dieses Bandenmuster erlaubt eine Identifizierung aller menschlichen Chromosomen. Zwischen dem aktiven und inaktiven X-Chromosom beim weiblichen Geschlecht wurde kein Unterschied gefunden. In kontrahierten Chromosomen gleichen die Banden denen, die bei der Quinacrine Fluoreszenzmethode gefunden wurden. Außerdem ist auch das centromere Heterochromatin, das bei der Quinacrine-Behandlung unsichtbar bleibt, stark angefärbt. Ebenso zeigt der distale Teil des langen Armes des Y-Chromosoms eine intensive Färbung.

In weniger kontrahierten Chromosomen von Prometaphasezellen können erheblich mehr Banden unterschieden werden. Dieses verfeinerte Bandenmuster ist ebenfalls für jedes homologe Chromosomenpaar charakteristisch, und ist grundsätzlich in allen untersuchten Prometaphasezellen gefunden worden. Wenn sich die Chromosomen während der Mitose kontrahieren verschmelzen einige dieser Banden, die manchmal sehr fein sind, und formen größere Banden, so wie sie in Metaphasechromosomen gefunden wurden. Noch in sehr kontrahierten Chromosomen können mehr Banden unterschieden werden als bei der Fluoreszenzmethode.

Das Bandenmuster ist nicht mit Chromosomenwindungen identisch, da im allgemeinen das Bandenmuster für jedes einzelne Chromosom in Prometaphase- und Metaphasezellen dasselbe ist, obwohl diese anders gewunden sind. Für die nahe Zukunft sieht Schnedl genaue Chromosomenkarten menschlicher Chromosomen voraus.

Snedl ist der Ansicht, daß die Methoden, die Arrighi, Hsu, Yunis u.a. benutzten, die Hypothese stützten, nach der das Heterochromatin, das bei diesen Methoden in den Centromeren lokalisiert ist, Chromosomenabschnitte darstellt, die repet-

tive DNS-Sequenzen enthalten. Darüberhinaus werden die Centromerabschnitte von Mäusechromosomen nach diesen Methoden stark angefärbt. Diese Centromerregionen der Maus sind von in situ-Kreuzungsversuchen dafür bekannt, aus repetitiver DNS zusammengesetzt zu sein. Die dunklen Banden, die über die Chromosomenarme verteilt sind, die durch die hier beschriebenen Verarbeitungen sichtbar gemacht werden können, könnten ebenfalls DNS-Sequenzen enthalten, die wenigstens teilweise damit verwandt sind. Von biochemischen Arbeiten her könnte man ebenso schließen, daß replizierende DNS-Sequenzen über das ganze Genom verstreut sind. Es ist aber durchaus möglich, daß andere Faktoren bei der Bildung dieser Bandenmuster mitspielen.

2.6 METHODE NACH DRETS UND SHAW

Drets und Shaw berichten, daß während der letzten 15 Jahre in der morphologischen Beschreibung normaler und anormaler menschlicher Chromosomen bemerkenswerte Fortschritte erzielt worden sind. Aber mit der konventionellen Zytologie und Autoradiografie sind wir bei weitem davon entfernt jedes einzelne Chromosom des menschlichen Chromosomensatzes zu identifizieren. Weiterhin hat sich herausgestellt, daß diese Techniken nicht geeignet sind, Einzelheiten innerhalb der Chromosomenarme erkennen zu lassen, so daß eine strukturelle Änderung, wenn sie nicht gerade mit einer Änderung der Länge oder der Zentromerregion oder nur ganz geringfügigen Veränderungen dieser Art verbunden waren, nicht entdeckt wurden.

Seit der Originalbeschreibung der spezifischen Fluoreszenzfärbung menschlicher Chromosomen haben Untersuchungen zur erneuten Hoffnung geführt, die klassischen Chromosomeneinteilungen (Einteilung nach Pätan in die Gruppen A - G, nach Denver in die Paare 1 - 22) durch eine zuverlässigere, individuelle Identifikation zu verbessern. In ihrem Beitrag beschreiben Drets und Shaw eine neue Methode menschliche

Chromosomen zu identifizieren, die keine Fluoreszenztechnik benötigt und in allen Präparaten erscheint. Die Chromosomen zeigen Bandenstrukturen in spezifischen Regionen. Zusätzlich zu den Geschlechts-Chromosomen wurden 20 von den 22 autosomalen Paaren mit dieser Technik identifiziert und die übrigen 2 versuchsweise klassifiziert.

Lymphozyten- und Fibroblastenkulturen normaler Personen wurden präpariert und in der üblichen Weise bearbeitet. 2 - 6 Stunden vor Beendigung der Zeit im Brutschrank wurden 0,04 μ g des Mediums den Kulturen zugefügt. Nach hypotoner Behandlung mit 1% Citrat und Fixation in Methanol-Eisessig 3:1, wurden die über der Flamme getrockneten Objektträger bereitet.

Die zu beschreibende Methode besteht darin, die Chromosomen in situ mit NaOH zu behandeln und hinterher in verschiedenen Konzentrationen Salz-Citratlösung zu inkubieren. Daraufhin färben sich spezifische Regionen der Chromosomenarme unterschiedlich mit gepufferter Giemsa-Lösung an. Weil eine Anzahl der Parameter in den Experimenten verändert wurden und die optimalen Bedingungen nicht gefunden wurden, beschrieben sie eine Grundvariation, mit der sie einigermaßen regelmäßig Banden erhielten und anschließend die Änderungen der Zeit und Konzentrationen, die getestet wurden.

Die Objektträger wurden für 30 sec in einer Lösung von 0,07n NaOH in 0,112m NaCl (pH 12,0) bei Raumtemperatur gebracht, dann 3 x in 12 x SSC (pH7,0) gewaschen, jedesmal 5-10 min. Dann wurden sie für 60-72 Stunden in 12 x SSC bei 65°C inkubiert.

Danach wurden die Objektträger 3 x in 70% und 3 x in 95% Äthanol für jeweils 3 min gebadet. Nach dem Lufttrocknen werden die Präparate 5 min in gepufferter Giemsalösung (pH6,6) gefärbt, kurz mit destilliertem Wasser abgespült, wieder luftgetrocknet und in Permount eingeschlossen.

Die alkalische Lösung wird aus 2,8 gr NaOH und 6,2 gr NaCl in 1 l destilliertem Wasser hergestellt. Die 12 x SSC wird aus 105,2 gr NaCl 52,9 gr Trisodium Zitrat in 1 l destilliertem Wasser hergestellt und mit 0,1 HCl auf Ph 7,0 gebracht. Die gepufferte Giemsa-Lösung besteht aus 5ml Giemsa stock solution (Curtin Scientific Co) 3 ml absolutem Methanol, 3,0 ml Zitronensäure mit destilliertem Wasser auf 100 ml aufgefüllt und mit 0,2 n Na_2HPO_4 auf pH 6,6 eingestellt.

Die beschriebene Methode brachte diskrete scharfe Bande in vielen Metaphasezellen hervor; diese Banden sind immer an derselben Stelle, die für ein bestimmtes Chromosom charakteristisch ist.

Folgende Methoden wurden ebenfalls benutzt: (a) NaOH-Behandlung bei 0°C und Raumtemperatur von 0-180 sec; (b) Inkubation in 2x, 6x, 12x und 24x SSC von 15 min bis 136 Std; (c) Giemsa-Färbung von 5-90 min; (d) Inkubation in 1:1 Formamid: 12x SSC bei 37°C für 1-5 Tage. Obwohl einige Kombinationen der obengenannten Dinge gelegentlich gute Ergebnisse brachten, hat es oft den Anschein, als ob die Bandenmuster undifferenziert seien. Eher als differenzierte Banden wurde hin und wieder ein Aufrolleffekt festgestellt. Ausgiebige NaOH-Behandlung (länger als eine Minute) brachte blasse geschwollene Chromosomen die "leer" aussahen. Andere Metaphasezellen erschienen kompakt, dunkel gefärbt mit normal erscheinenden Chromosomen. Mit der zuerst beschriebenen Methode schienen mehr "informative" Zellen erreicht zu werden. Nur Zellen, die wohlausgebreitete Chromosomen mit differenzierten Banden zeigten, wurden ausgewählt und fotografiert.

15 ausgewählte Zellen von 3 männlichen Individuen wurden fotografiert und ohne Rücksicht auf Bandenmuster kariotypiert. Die Fotografien der Chromosomen wurden in folgende Gruppen unterteilt: A1, A2, A3, B, C, D, E, F und G und Y. Fotografien verzerrter, geschwollener und sich überlappender Chromosomen wurden ausgeschieden und die Übriggebliebenen auf der Rückseite mit Nummer und Gruppe beschriftet. Die Chromosomenfotografien aller 15 Zellen wurden dann in Gruppen zusammengefaßt. An diesem Punkt unterteilten Drets und Shaw jede

Gruppe, entsprechend der Bandenmuster, ohne die Identität der Zellnummer zu kennen. Diese Methode würde zeigen, ob die Anzahl der erscheinenden Banden gleich wäre, größer oder kleiner als die Anzahl der Paare in dieser Gruppe, und ebenso, ob es 2, mehr oder weniger Chromosomen gäbe, die das gleiche Band Endmuster zeigen.

Vollständige Kariotypen dieser 15 Zellen und anderer Zellen männlicher und weiblicher Blutspender wurden mit dieser Methode analysiert um die Zuverlässigkeit und Nützlichkeit dieses Idiogrammprototypen der Banden um individuelle Paare zu identifizieren, zu prüfen.

Man kam zu folgenden Ergebnissen:

Als erstes wurde eine genaue Analyse der Gruppe D 13-15 aufgezeigt. Die anderen Gruppen wurden auf gleiche Weise analysiert. Unter den 90 D-Chromosomen in den 15 Zellen, konnten 3 nicht morphologisch identifiziert werden, weil sie fehlten, verzerrt waren oder sich überlappten. Unter den übrigen 87 D-Chromosomen brachten 21 keine Informationen über Bandenmuster, weil sie geschwollen waren und keine Banden zeigten, oder weil die Banden eher wirr als differenziert waren. Drei Bandenmuster fielen sofort auf. Jedes der 87 D-Chromosomen wurde in diese 3 Gruppen als "definitiv", "möglicherweise" oder "unidentifizierbar" eingeordnet.

Diese Muster wurden willkürlich D13, D14 und D15 genannt. Die Banden von D13 wurden von der breiten vielgebänderten Region in den distalen 2/3 des langen Armes gekennzeichnet. Die Banden von D14 hatten mehrere Banden im proximalen 1/3 des langen Armes und eine schwache Bande nahe dem Ende des langen Armes. Die Banden von D15 zeigten eine schwache undefinierbare Bänderung, mit Ausnahme einer einzigen feinen dunklen Bande in der Mitte des langen Armes.

Tabelle

Analyse der Bandenmuster der D-Gruppen-Chromosomen
in 15 Zellen

Zell-Nr.	M u s t e r			
	D13	D14	D15	nicht identifiziert
1	0	3	1	2
2	2	2	1	1
3	2	1	2	1
4	2	2	1	1
5	1	2	1	2
6	1	0	2	3
7	2	1	1	2
8	2	2	2	0
9	1	1	2	2
10	2	2	2	0
11	2	1	1	2
12	2	1	1	2
13	1	1	1	3
14	2	2	2	0
15	0	2	1	3
Total	22	23	21	24
endgültig	13	14	10	
möglich	9	9	11	

Eine tabellarische Übersicht (s. Tabelle S.36) zeigt, daß 22, 23 und 21 Chromosomen den 3 Mustern zugeordnet werden konnten. In 3 Zellen waren alle 6 D-Chromosomen in diese 3 Paare eingeteilt. Nur ein einziges Mal zeigten 3 Chromosomen dasselbe Bandenmuster. In diesem Fall wurde eines von ihnen als "möglich" eingestuft. Dieses Chromosom war überfärbt und das Ratspiel einfach falsch. Es ergibt sich also, daß 75% der D-Chromosomen durch das ausgesprochen spezifische Bandenmuster identifiziert wurden.

Die C-Gruppe verdient einen besonderen Kommentar. Als erstes wurden nur 7 Muster gefunden (es sollten eigentlich theoretisch 8 sein). Aber in den meisten Fällen zeigten 3 oder 4 Chromosomen dasselbe Muster; das ist darauf verdächtig, daß wir es hier mit zwei Personen zu tun haben. Diese wurden versuchsweise C11 und C12 genannt. Weiterhin sollte, da weiterhin ausschließlich männliche Zellen analysiert wurden, sich ein Muster zeigen, das nur in einem Chromosom, dem X, erscheint. Dies trat tatsächlich auf. Nur in einer der 15 Zellen wurden 2 Chromosomen mit diesem Muster gefunden.

Die analytische Methode, die oben beschrieben wurde, wurde dazu benutzt, die spezifischen chromosmalen Merkmale festzusetzen, die in Zukunft benutzt werden, um komplette Zellen anderer Spender zu kariotypieren. Dies wurde durch einige gesunde Individuen und 2 phänotypisch gesunde Personen, die eine morphologisch faßbare Chromosomenvariante geboren hatten, vervollständigt.

Die Spezifität der Banden wurde durch die Übereinstimmung folgender Bandenmuster unterstützt: Schwesterchromatiden desselben Chromosoms, homologe Chromosomen innerhalb einer jeder Zelle, Zellen desselben Individuums, Zellen von verschiedenen Individuen. Diplochromosomen in diploiden Zellen und Chromosomen in polyploiden Zellen.

Offensichtlich läßt die beschriebene Technik genaue und spezifische Bandenmuster der Chromosomen erscheinen. Obwohl der Molekularmechanismus, der diese Banden hervorbringt, noch unverständlich ist, so stellen Drets und Shaw doch einige Hypothesen vor.

Die Grundtechnik ist eine Modifikation der Arbeiten von Pardue und Gall, die von Arrighi und Hsu wiederholt wurde, um das konstitutive Heterochromatin der menschlichen Chromosomen speziell anzufärben. Arrighi und Hsu benutzten HCl-Behandlung, um die Histone und andere nicht-saure Proteine auseinander zu bringen, RNase um die chromosomengebundene RNS zu entfernen, dann für 2 min NaOH-Behandlung der Chromosomen in situ und Inkubation in 2x oder 6x SSC für 18 - 24 Std bei 65°C. Die dunkelgefärbten Heterochromatinblöcke, die bei der Giemsaefärbung nach dieser Behandlung enthüllt wurden, erschienen in folgenden Regionen: kleine Blöcke in den paracentromeren Regionen aller Chromosomen (proximales oder centromeres Heterochromatin). Größere Blöcke in den proximalen langen Armen der Chromosomenpaare A1, C9 und E16 (Regionen der Sekundärstruktur); und ein sehr herausstechender Block im distalen 2/3 des langen Armes des Y-Chromosoms (Y-Heterochromatin).

Zur Erleichterung bezeichnen Drets und Shaw die Methode von Arrighi und Hsu als "Block"technik und stellen ihr als eigene Methode als "Banden"technik gegenüber. Zwischen beiden gibt es positive und negative Korrelationen.

a) Das centromere Chromatin ist in der Bandentechnik weniger auffällig.

b) Die Sekundärstruktur von A1 und E16 sind bei beiden Techniken gefärbt, aber in C9 ist diese Übereinstimmung nicht gegeben. Die Sekundärstruktur von C9 wird in der Blocktechnik stark angefärbt, bei der Bandenfärbung wird es nicht sichtbar angefärbt-

c) Das Y-Heterochromatin ist die am stärksten gefärbte Region menschlicher Chromosomen in beiden Methoden, aber zusätzlich wird in der Bandentechnik das proximale 1/3 und manchmal ebenso die kurzen Arme stark gefärbt, im Gegensatz zur Blockmethode.

d) Vergleiche männlicher und weiblicher Zellen zeigen, daß das X-Chromosom mit der Blockmethode nicht identifiziert werden kann. Das X-Bandenmuster war bei der Bandenmethode in männlichen Zellen 1x und in weiblichen Zellen 2x vorhanden. Folglich entspricht das fakultative Heterochromatin des spätreplizierenden X nicht der Bandentechnik.

Da die Blockmethode auf einem Prozeß der Denaturierung und Renaturierung beruht, ist man versucht zu unterstellen, daß es sich um zähe, frührepetetitive DNS handelt, während die Banden, die über das ganze Genom verteilt sind, Familien von wiederholten Sequenzen, die weniger häufig vorkommen, sein sollen. Die ungefärbten Regionen zwischen den Banden könnten dann an der Stelle einzelner Nukleotidsequenzen stehen. Diese Hypothese wird von der Tatsache unterstützt, daß eine längere Inkubation benötigt wird, um die Banden zu erhalten.

Drets und Shaw fanden, daß 12x SSC bedeutend bessere Banden hervorbrachte als 2x, 6x oder 24x SSC. Inkubation unterhalb einer bestimmten Zeit oder ohne vorherige NaOH-Behandlung zeigten nur eine "Vorstellung" sehr schwacher Banden, oder überhaupt keinen Effekt. Darüberhinaus beobachteten sie während verschiedener Perioden eine Anzahl von Wechseln. Bevor die Banden in den Chromosomen erschienen, stellte sich ein "Aufrollen" ein, und nach längerer Inkubation erscheinen die Chromonemata diskreter, während bei bestimmten Vereinfachungen Chromosomen mit einem "Strahlenbündel"- (Lampenbürsten)Phänomen hervorgebracht werden.

Das würde bedeuten, daß während des Bandenbildenden Vorgangs die Wicklungen anders aufgespult werden. In dieser Hinsicht hat Shyraishi in letzter Zeit hervorgegestellt, daß menschliche Leukozytenchromosomen eine unterschiedliche Reaktivierung zeigen, wenn sie in den letzten 24 Stunden bei niedrigen Temperaturen ($0-3^{\circ}\text{C}$) gehalten wurden. Hervorstechende Segmente oder Windungen erscheinen entlang den Chromosomenarmen in ordnungsgemäßer Sequenz und unterscheiden so individuelle Paare. Es ist unbekannt, ob eines dieser Segmente mit den oben beschriebenen Heterochromatinbanden übereinstimmt.

Die Giemsaefärbung ist von größter Bedeutung. Beide, die Qualität der Farbe und die Färbungszeit sind von Bedeutung, da Überfärbung die Banden verbirgt. Möglicherweise tritt die Giemsaefarbe in eine sehr spezifische Wechselwirkung mit den Chromosomen. In vorbehandelten Präparaten, die nicht mit Aceto-Orcein gefärbt wurden, waren keine Banden sichtbar.

Von Caspersson u.a. wurde mit der Fluoreszenztechnik die spezifische Affinität bestimmter Chemikalien zu Chromosomensegmenten dargestellt. Augenscheinlich stimmen die Heterochromatinbanden mit wenigen Ausnahmen eher mit den Fluoreszenzbanden des Quinacrine mustard überein. Einige Bemerkungen sind angebracht: a) Die centromere Heterochromatinregion und die Sekundärstruktur von A1, C9 und E16 fluoreszieren nicht so stark wie die Arme der Chromosomen. B) Das Y-Heterochromatin fluoresziert sehr stark und wird in beiden Methoden, sowohl Block- als auch Bandentechnik stark angefärbt. c) Die stark fluoreszierende Bande in der Nähe des Centromers von A3 wird mit keiner der beiden Techniken gefärbt. d) Die Mittelregion des kurzen Armes von C6 zeigt weder Fluoreszenz noch Banden.

Individuen mit strukturellen Chromosomenwiederherstellungen können nun zur Identifizierung auf Umkehrung der Chromosomen geprüft werden. In den Zellen einer phänotypisch normalen Person wurde ein D-Chromosom mit einem riesigen Satelliten durch

das Bandenmuster als D13 identifiziert. Demzufolge verspräche die Bandenmethode für die weitere Intifizierung und Beschreibung von Chromosomenvariationen in gesunden und krankhaften Zuständen einiges. Die Methode sei einfach und könne leicht an die Laborroutine angeglichen werden. Es sollte möglich sein, die Analysen zu verfeinern und die Ergebnisse zu mehren, indem man Comüuter prüfen läßt oder mikropektrofotometriert.

2.7 Hitze-Denaturierung

Eine weitere einfache Technik, mit deren Hilfe man Zusammenhänge zwischen Heterochromatin, spät replizierender DNS und Satelliten-DNS und der Lokalisation andere Arten der replizierenden DNS in Metaphasechromosomen erkennen kann, wird von Yunis, Roldan, Yasmineh und Lee beschrieben. Vor einiger Zeit wurde festgestellt, daß die DNS über 30% replizierende Sequenzen enthält, von denen 1/3 früh replizierend ist, die im autosomalen Heterochromatin lokalisiert sind. Wie man aus dem zerfließenden Profil der renaturierten Produkte erkennen kann, ist diese letzte Fraktion heterogen.

Um ein klares Bild der replizierenden DNS zu erhalten, wurden die DNS-Stränge in Metaphasechromosomen denaturiert. Dann wurden ihnen verschieden lange Zeit gelassen, sich wieder zu renaturieren. Auf diese Art und Weise müßte im Laufe der Zeit eine Zunahme der Dunkelfärbungen in den Regionen der replizierenden DNS zu sehen sein, die scharf zu den nicht gefärbten der nicht replizierenden DNS kontrastieren müßten.

Herkömmliche Präparate von Metaphasechromosomen wurden für 10 min bei 85-100°C in 0,06 mol Phosphatpuffer bei pH 6,8 denaturiert und im selben Puffer verschieden lange Zeiten bei 65°C inkubiert und anschließend mit Giemsa gefärbt.

In menschlichen Chromosomen ist ohne Inkubation keine Renaturierung zu erkennen. Nach 5-15 min renaturieren sich die DNS-Stränge in kleinen Regionen um die Centromere und im distalen Teil des langen Arms des Y-Chromosoms. Nach längerer Zeit (30 min) nimmt die Anzahl und Größe der renaturierten Gebiete zu. Die Renaturierungsbanden scheinen selektiv zu sein, wie man z.B. an den dunklen Renaturierungsgebieten der Chromosomen 4, 13, 16, 18 und Y erkennen kann, von denen man weiß, daß sie spät replizierend sind. Im Gegensatz dazu bleiben Chromosomen wie 15 und 21 und Segmente einer Anzahl von Chromosomen denaturiert (also schwach gefärbt), und es ist bekannt, daß sie früh replizieren.

Ebenso wurden Metaphasechromosomen der Maus studiert, in denen festgestellt wurde, daß die Regionen um die Centromere heterochromatisch, spät replizierend und aus replizierender Satelliten-DNS zusammengesetzt sind. Nach einer Inkubationszeit von 15-30 min erscheinen diese Gebiete als dunkelgefärbte Massen, viel größer als jene, die beim Menschen beobachtet wurden. Einen ähnlichen Zusammenhang zwischen Heterochromatinregionen, spät replizierender und repetetiver DNS scheint ebenfalls bei der europäischen Feldwühlmaus, *Microtus agrestis*, vorhanden zu sein. Die Chromosomen dieses Tieres sind einzigartig, da der größte Teil des autosomalen Heterochromatins in die Geschlechtschromosomen translociert zu sein scheint, die folglich die Form zweier außergewöhnlich großer Chromosomen haben. Die langen Arme dieser riesenhaften Chromosomen sind spät replizierend und im Verhalten Heterochromatisch. Kürzlich wurde gezeigt, daß sie aus repetetiver DNS zusammengesetzt sind in allen Zelltypen während der Entwicklung heterochromatisch bleiben. Vorläufige, bis jetzt noch nicht bewiesene Zeugnisse deuten an, daß nach 30 min Inkubation eine Renaturierung dieser beiden riesenhaften Chromosomen und in kleinen Gebieten um die Centromere erfolgt.

Man sollte versuchen zu verstehen, warum die Sequenzen der repetitiven DNS rascher renaturieren, als die der nicht repetitiven. Eine logische Erklärung wäre die, daß unter den zur Renaturierung gegebenen Bedingungen die DNS-Stränge diese Präparate in halbflüssigem Zustand völlig hydriert sind, wodurch ein gewisses Gleiten in verschiedenen Gebieten der DNS-Doppelhelix möglich wird. Unter diesen Bedingungen würde ein Gleiten irgendeines Ausmaßes in der nicht-repetitiven DNS-Region eine Renaturierung vollständig verhindern, wohingegen in der repetitiven DNS-Region das Gleiten dennoch eine Renaturierung erlauben würde. Wenn man weiter annimmt, daß eine gewisse seitliche Verschiebung der komplementären Stränge möglich ist und wenn man weiß, daß die DNS in Metaphasechromosomen dicht gepackt, eng gerollt und gewunden ist, so kann man annehmen, daß denaturierte Stränge eines Segments der repetitiven Region sich mit komplementären Strängen eines anderen Segments, das sich in einer bestimmten Entfernung befindet, renaturieren, d.h. sich wieder verbinden können.

Einige Dinge zur Erinnerung/: a) Wenig ausgebreitete Mitosen scheinen weniger geeignet zu sein, Metaphasechromosomen zu renaturieren. b) Die Benützung von Formaldehyd und/oder Puffer von geringer Holarität können versucht werden um die Temperaturen zu senken und so die Hitzeartefakte zu vermindern. c) In Genomen, in denen repetetive DNS-Sequenzen dafür bekannt sind, sich wahrnehmbar im Guanin-Cytosinegehalt und in der von der übrigen DNS zu unterscheiden, könnte zusätzlich eine selektive Denaturierung einer DNS-Art (mit wenig Guanin-Cytosin) erreicht werden. Ein gutes Beispiel hierfür ist die Satelliten-DNS des Kalbs, die im Heterochromatin von Leberzellkernen isoliert wurde. Diese DNS enthält sehr viel Guanin-Cytosin (55%) und ihr Schmelzpunkt ($91,4^{\circ}\text{C}$) liegt um 6°C höher, der Hauptmasse der DNS ($85,4^{\circ}\text{C}$); d) Auf derselben Grundlage kann repetetive DNS, die sich merklich von der Hauptmasse unterscheidet, besser sichtbar gemacht werden, wenn man Reagentien benutzt, von denen man weiß, daß sie sich bevorzugt an Guanin-Cytosin oder Adenin-Thymin-Paare binden, wie

z.B. Ag^+ oder Hg^{++} Ionen. Es ist interessant, daß schon vor ungefähr 25 Jahren Levan berichtet hatte, daß eine Vorbehandlung von Metaphasechromosomen mit Hg^{++} eine bevorzugte Färbung des paracentromeren Heterochromatins bei einer großen Anzahl von Pflanzen- und Tierarten ergab.

2.8 Trypsin - Leishman

Obwohl gewöhnliche Chromosomenpräparate geeignet sind, erfordern die neuen Methoden entweder spezielle Ausrüstung oder viel Zeit, bis zu 3 Tagen. Eine schnelle einfache Methode wäre vorteilhaft. Eine solche Methode war das Ergebnis von Experimenten, in denen man mit der Färbung eine Enzymverdauung durchführte, mit der ursprünglichen Absicht, sich um eine Entspiralisation von Mitosechromosomen zu bemühen. Der ganze Vorgang wird bei Raumtemperatur ausgeführt und mit luftgetrockneten Präparaten beginnend, sind die gefärbten Präparate in 10 min oder weniger zur Beobachtung fertig.

Auf herkömmliche Weise luftgetrocknete Präparate werden mit 0,075 mol KCl als hypotones Medium 4-5 min bei 37°C behandelt. Dann werden sie mit 3 Teilen Methanol und einem Teil Eisessig fixiert. Die ausgewählten Präparate werden in horizontaler Lage 10-15 sec mit 0,25% Trypsin in isotoner NaCl-Lösung gespült und 2 x mit isotoner NaCl-Lösung nachgespült. Zu diesem Zeitpunkt kann das nasse Präparat unter dem Phasenkontrast-Mikroskop beurteilt werden, um die Wirkung des Enzyms zu überwachen, und wenn notwendig, noch einmal kurze Zeit behandelt werden. Dann werden die Präparate 3-5 min in einer Lösung aus 1/4 Leishman und 3/4 Puffer bei pH 6,8 gefärbt und anschließend im selben Puffer gut gespült. Wenn die Färbung zu stark geraten ist, kann man sie durch weiteres spülen mit Puffer abschwächen. Zum Schluß wird der Objektträger getrocknet, in Xylol gespült und anschließend eingebettet.

Die so erhaltenen Banden sind in homologen Paaren sehr ähnlich, und stimmen mit denen überein, die bei anderen, mühsameren Techniken, mit Giemsa gefärbt erhalten werden. In den am besten zu beurteilenden Zellen erstrecken sich die Banden über beide Chromatiden in gleichmäßiger Weise, die sehr an die Banden erinnern, die man in den Speicheldrüsen der Drosophila u.a. Zweiflüglern findet. Wie bei anderen Techniken, so ist auch hier das Bandenmuster von Zelle zu Zelle verschieden deutlich, aber es hat sich herausgestellt, daß in einer großen Anzahl von Metaphasezellen, sowohl die Ausbreitung, als auch die Deutlichkeit des Bandenmusters ausreichend ist.

Aufbewahrte Präparate, die bis zu einem Jahr alt waren, lieferten ein Bandenmuster, das den frischen durchaus vergleichbar war. Außerdem ergaben ein paar 3 Jahre alte Präparate, wenn man sie mit 1% Na-Citrat-Lösung vorbehandelte, Chromosomenausbreitungen, die für eine Erkennung individueller Chromosomen völlig ausreichten.

2. 9 DIFFERENZIELLE SPIRALENBILDUNG ENTLANG MITOTISCHER SAUGETIERCHROMOSOMEN

I. Durch BUdR aufgezeigte Differenzierung bei den Chromosomen des chinesischen Hamsters

A.F. Zakharov und N.A. Egolina

Zusammenfassung. Die Morphologie von Chromosomen, die sich bei Anwesenheit von 5-bromodeoxyuridin replizieren, wurde unter Verwendung von langfristigen Zellkulturen des chinesischen Hamsters (Linie Bldd-ii-FAF28) untersucht. Die zytologische Einwirkung des Analogikums, das in verschiedenen Konzentrationen bei verschiedenen Stadien der S-Periode und während eines und zweier aufeinander folgender mitotischer Zyklen verabreicht wurde, wurde untersucht. - Die hauptsächliche Zytologische Darstellung der BUdR-Einwirkung bestand

in einer Vergrößerung der Spiralbildung bei gewissen Chromosomen-Regionen. Der Grad der Verzögerung war von der Zeitspanne abhängig, die zwischen der Einbringung des Wirkstoffes und der Mitose lag, sowie von der Konzentration des Wirkstoffes. Bei einer Verlängerung der Zeitspanne nahm die Verzögerung der Spiralbildung ab und verschwand schließlich, weshalb sie nur in den spät-replizierenden Chromosomen-Regionen zu beobachten ist. Eine erhöhte Konzentration des BUdR (im Bereich von 25 bis 400 µg/ml) erbrachte eine Verbesserung der Verzögerung in der Chromosomen-Spiralbildung.

Nach zwei aufeinander folgenden Reproduktionszyklen in Anwesenheit von BUdR enthielt eine große Zahl von Metaphasen Chromosomen, deren Schwesterchromatide eine ungleichmäßige Verzögerung bei der Spiralbildung zeigten. Die Autoradiographie der H-BUdR-Verteilung zeigte auf, daß das Schwesterchromatid mit einer ausgeprägteren Unterspiralbildung dem Chromatid entspricht, bei dem das BUdR in beide Stränge des Desoxyribonukleinsäure- (DNA) - Moleküls inkorporiert sind. - Die Mechanismen der beobachteten Einwirkung wie auch der chemische Einfluß auf die Chromosomen-Spiralbildung als ein nützliches Werkzeug zur Darstellung einer linearen Chromosomen-Differenzierung werden abgehandelt.

Einführung. Die moderne Säugetier- und besonders Humanzytogenetik widmet der Untersuchung der linearen Differenzierung von Chromosomen wegen der vielen Potentiale für eine sich radikal verbessernde Chromosomen-Identifizierung immer größere Beachtung. Diese Studie wird nach drei Richtungen hin durchgeführt. Die erste ist eine Analyse des Chromosomen-Fluoreszenzmusters nach einer Fluorochrom-Behandlung (Caspersson, 1969; Caspersson et al., 1970; Caspersson et al., 1971). Die Untersuchungen nach der zweiten Richtung hin basieren auf der autoradiographischen Unterscheidung von Chromosomen-Regionen, die sich auf repetitiven DNS zusammensetzen, in Versuchen mit Ribonukleinsäure-Desoxyribonukleinsäure- (RNS-DNS) -

Hybridisation bei zytologischen Präparaten (Pardue and Gall, 1969 1970; John et al., 1969; Jones and Corneo, 1971). Bei der dritten handelt es sich um den Einsatz der sogenannten modifizierten Giemsa-Einfärbtechniken, wobei die wichtigste Modifizierung Alkali- oder Wärme- "Denaturations"- und darauf folgende "Renaturations"-Verfahren vor dem Einfärben sind (Pardue and Gall, 1970; Arrighi and Hsu, 1971; Yunis et al., 1971; Dutrillaux and Lejeune, 1971; Summer et al., 1971).

Die Differentialeinfärbung von Chromosomen wird durch die unterschiedliche Fähigkeit verschiedener Chromosomen-Regionen zur DNS-Renaturation und Einfärbung nach vorausgegangener Denaturation erklärt. Die lineare Chromosomen-Differenzierung, die sich mit Hilfe sämtlicher erwähnter Techniken zeigte, wird hauptsächlich als Ergebnis einer chemischen Heterogenität des Chromosoms an seiner Längskante entlang im Hinblick auf DNS interpretiert.

Unsere Untersuchung der Differenzierung entlang mitotischen Chromosomen basiert auf einer anderen Vorgehensweise. Wir unterstellen, daß Potentiale für Chromosomen-Differenzierung auf dem folgenden beruhen:

- (a) Das Chromosom im Hinblick auf seine Hauptfunktionen (genetische Aktivität, Reproduktion und Spiralenbildung) benimmt sich als ein Komplex relativ autonomer Einheiten, die in linearer Ordnung angeordnet sind;
- (b) diese Funktionen stehen in enger Wechselbeziehung im Hinblick auf die Zeit ihres Ausdruckes.

Insbesondere wird angenommen, daß die wohlbekannte intrachromosome Asynchronie der DNS-Synthese zu den Endstadien der S-Periode die intrachromosome Asynchronie beim Beginn der mitotischen Spiralenbildung konditioniert, wobei die zuletzt replizierenden Regionen entsprechend später Spiralen bilden. Im normalen Verlaufe des mitotischen Zyklus gleicht

sich die Asynchronie der Spiralenbildung zur Metaphase hinaus. Man kann jedoch hoffen, ihr Vorhandensein in der Metaphase durch eine experimentelle Verzögerung der Spiralenbildung spät replizierender Regionen durch die chemische Hemmung entweder der DNS-Synthese am Ende der S-Periode oder Proteinsynthese bei der G₂-Periode darzustellen. So würde der Asynchronismus der DNS-Replikation entlang dem Chromosom einen morphologischen Ausdruck in ungleicher Spiralenbildung an seiner Längsseite entlang finden.

Diese Hypothese wurde als Ergebnis unserer Arbeit aufgestellt, die an Chromosomen des chinesischen Hamsters unter Verwendung von Colcemid durchgeführt wurden (Zacharov and Egoline, 1968, 1969), was zum ersten Male zur Beeinflussung der Chromosomen-Spiralenbildung von Stubblefield (1964) empfohlen wurde. In diesem Bericht zeigen wir die Ergebnisse der Studie der Differenzierung entlang der Chromosomen des chinesischen Hamsters auf, die durch eine BUdR-Behandlung erzielt wurde. Diese Ergebnisse bestätigen die aufgestellte Hypothese voll und ganz. Es hat sich gezeigt, daß dieser Wirkstoff die Spiralenbildung bei spät replizierenden Chromosomen-Regionen hemmt. In diesem Zusammenhang wird die zuvor beschriebene Verbesserung der sekundären Konstriktionen unter dem Einfluß von BUdR (Hsu and Somers, 1961; Kaback, Sak-sela and Mellman, 1964; Palmer and Funderburk, 1965; Palmer, 1970; Huang, 1967) von uns lediglich als ein Ausdruck mit BUdR durchgeführt, um die optimalen Bedingungen zur Erzielung der erwähnten Wirkung herauszufinden. Es wurden verschiedene Konzentrationen des Wirkstoffes und verschiedene Anwendungszeiträume im mitotischen Zyklus getestet. Die Abhängigkeit der zytologischen Wirkung auf die BUdR-Einbegreifung in einen oder beide Stränge des DNS-Moleküls wurde untersucht. Die erzielten Ergebnisse sind teilweise veröffentlicht worden (Zacharov and Egolina, 1970; Egolina and Zacharov, 1971 a, b). In diesem Bericht wird die Arbeit zusammengefaßt, und es wird der Versuch gemacht, den Mechanismus der beobachteten zytologischen Wirkung des BUdR zu erklären, um die Suche nach neuen Chemikalien zu erreichen, die eine differentielle Spiralenbildung entlang dem Chromosomen induzieren können.

Asynchronismus der DNS-Replizierung entlang dem Chromosom einen morphologischen Ausdruck in ungleicher Spiralbildung an seiner Längsseite entlang finden.

Diese Hypothese wurde als Ergebnis unserer Arbeit aufgestellt, die an Chromosomen des chinesischen Hamsters unter Verwendung von Colcemid durchgeführt wurden (Zakharov and Egolina, 1968, 1969), was zum ersten Male zur Beeinflussung der Chromosomen-Spiralbildung von Stubblefield (1964) empfohlen wurde. In diesem Bericht zeigen wir die Ergebnisse der Studie der Differenzierung entlang der Chromosomen des chinesischen Hamsters auf, die durch eine BUdR-Behandlung erzielt wurde. Diese Ergebnisse bestätigen die aufgestellte Hypothese voll und ganz. Es hat sich gezeigt, daß dieser Wirkstoff die Spiralbildung bei spät replizierenden Chromosomen-Regionen hemmt. In diesem Zusammenhang wird die zuvor beschriebene Verbesserung der sekundären Konstriktionen unter dem Einfluß von BUdR (Hsu and Somers, 1961; Kaback, Saksela and Mellman, 1964; Palmer and Funderburk, 1965; Palmer, 1970; Huang, 1967) von uns lediglich als ein Ausdruck dieser Fähigkeit interpretiert. Wir haben eine Serie von Versuchen mit BUdR durchgeführt, um die optimalen Bedingungen zur Erzielung der erwähnten Wirkung herauszufinden. Es wurden verschiedene Konzentrationen des Wirkstoffes und verschiedene Anwendungszeiträume im mitotischen Zyklus getestet. Die Abhängigkeit der zytologischen Wirkung auf die BUdR-Einbegreifung in einen oder beide Stränge des DNS-Moleküls wurde untersucht. Die erzielten Ergebnisse sind teilweise veröffentlicht worden (Zakharov and Egolina, 1970; Egolina and Zakharov, 1971 a, b). In diesem Bericht wird die Arbeit zusammengefaßt, und es wird der Versuch gemacht, den Mechanismus der beobachteten zytologischen Wirkung des BUdR zu erklären, um die Suche nach neuen Chemikalien zu erreichen, die eine differentielle Spiralbildung entlang dem Chromosom induzieren können.

MATERIALIEN UND METHODEN

Zellkulturen

Vegetativ hervorgebrachte Züchtungsstämme 237 (unterstämme A und B) und 401 von gezüchteten Zellen chinesischen Hamsters, die aus der Reihe Bild-ii-FAF28 deriviert waren, wurden verwendet (Hakharov, Kaköakova, Egolina und Pogosianz, 1964). Beide Züchtungsstämme waren durch die Anwesenheit von fünf Chromosomen mit großen spät replizierenden Segmenten in dem hypodiploiden Karyotyp gekennzeichnet: Zwei X-Chromosomen und drei Markierer (Zakharov, Egolina and Kakpakova, 1966). Die Zellen wurden in Eagle's-Medium*) gezüchtet, das durch 10% Rinderserum ergänzt wurde. Die meisten Versuche wurden mit asynchroben Kulturen durchgeführt. Bei der Untersuchung der BUdR-Inkorporierung in beide Stränge des DNS-Moleküls während des zweiten mitotischen Zyklus wurde eine synchrone Kultur verwendet. Das Synchronisationsverfahren war ähnlich wie das, das von Stubblefield und Klevecz (1965) beschrieben wird. Der Prozentsatz von Metaphasen in einer Zellsuspension vor dem Ansetzen lag bei etwa 90%. Die synchrone Zellteilung begann etwa 15 Stunden nach dem Ansetzen, wobei die maximale mitotische Aktivität nach 18 bis 19 Stunden auftrat.

Verabreichung von BUdR

Nach vorläufigen Untersuchungen wurde das folgende Schema der Verabreichung von BUdR verwendet, um einen eindeutigen Chromosomen-Effekt zu erzielen. Das Analogon wurde dem Wachstumsmedium in einer Endkonzentration von 100 bis 200 µg/ml zugefügt. 2 bis 2 1/2 Stunden später wurden die Kulturen mit einer

*) Anm.d.Übers.: Eagle's Medium: Ein Gewebekulturmittel, enthält Vitamine, Aminosäuren, anorganische Salze, Seren und Dextrose.

abgeglichenen Salzlösung gewaschen und dann in das ursprüngliche Medium reinkubiert, dem 10 ug/ml Thymidin zugesetzt worden waren. Die Chromosomen-Preparationen wurden 4 bis 5 Stunden nach Beginn der BUdR-Behandlung durchgeführt.

Um die Dosenabhängigkeit des BUdR-Chromosomeneffektes zu untersuchen, wurden zwei Versuche durchgeführt, wobei der Unterstamm 237 A verwendet wurde. Die Kulturen wurden mit BUdR in einer Konzentration von 25, 50, 100, 200 und 400 ug/ml 2 Stunden lang inkubiert und dann wie oben beschrieben verarbeitet. Die Zellen für die Chromosomenpräparate wurden 4 Stunden nach dem Beginn der BUdR-Inkorporierung geerntet.

In 6 Versuchen wurde die Analyse der BUdR-Einwirkung nach der Inkorporierung in DNS bei verschiedenen Punkten der S-Periode durchgeführt, wobei beide Unterstämme des Klons 237 verwendet wurden. Der Wirkstoff wurde in einer Endkonzentration von 100 oder 200 ug/ml eine Stunde lang verabreicht, 3, 4, 5, 6 und 8 Stunden nach Einleitung der BUdR-Behandlung wurden Muster für Chromosomen-Präparate entnommen.

Zur Untersuchung des Chromosomeneffektes nach der BUdR-Inkorporierung in beide Stränge des DNS-Moleküls (in zwei aufeinanderfolgenden mitotischen Zyklen) wurden vier Versuche nach dem folgenden Schema durchgeführt. Während des ersten mitotischen Zyklus wurde BUdR asynchronen Kulturen in einer Konzentration von 100 oder 200 ug/ml 3,5 bis 4 Stunden lang bis zur Zellernte hinzugefügt. Während der letzten 2 Stunden wurde 0,03 ug/ml Colcemid den Kulturen zugefügt, um Metaphasen für den synchronen Durchlauf durch den zweiten mitotischen Zyklus zu sammeln. Vor dem Einsammeln wurden die Metaphasen mit Eagle's Medium, das 10 ug/ml Thymidin enthielt, gewaschen.

Im zweiten mitotischen Zyklus wurde BUdR in der gleichen Dosis 15 Stunden nach dem Ansetzen der Zellen in Metaphase hinzugefügt. Die Zellen wurden in Anwesenheit des Analogens 4 Stunden lang bis zur Beendigung der Inkubationszeit kultiviert.

CHROMOSOMEN-PRÄPARATE

Bei allen Versuchen wurde Colcemid in einer Dosis von 0,03 bis 0,06 $\mu\text{g/ml}$ zur Abstopfung der Zellen in der Metaphase verwendet. Chromosomenpräparate wurden nach der Lufttrockentechnik und durch Einfärben mit Blau-Eosin hergestellt.

AUTORADIOGRAPHISCHES VERFAHREN

Mit Tritium behandeltes BUdR einer spezifischen Aktivität 0,54 C/mM (Radiochemical Center, Amersham, England) wurde während der Untersuchung verwendet. Bei den Versuchen mit der analogen Inkorporierung in einen Strang des DNS-Moleküls, wurde ^3H -BUdR entweder in eine Konzentration von 1 $\mu\text{C/ml}$ 15 Minuten lang eingeführt, wobei die Zellen 6 bis 8 Stunden später geerntet wurden (Frühmarkierungsmuster) oder aber in einer Konzentration von 0,5 $\mu\text{C/ml}$ 2 Stunden lang bis zur Erntezeit (Spätmarkierungsmuster). Vor der Markierung mit Isotopen wurden die Kulturen eine Stunde lang mit 100 $\mu\text{g/ml}$ von unmarkierten BUdR inkubiert, um eine differentielle Chromosomen-Spiralbildung hervorzurufen.

Bei den Versuchen, in denen BUdR in beide Stränge der Chromosomen DNS inkorporiert wurde, wurde das mit Tritium behandelte Analogon bis zu einer Endaktivität von 1 $\mu\text{C/ml}$ 30 Minuten lang in beiden mitotischen Zyklen hinzugefügt, und zwar unmittelbar vor der Zugabe von unmarkiertem BUdR. Die autoradiographische Technik ist bereits früher beschrieben worden (Zakharov, Egolina, Kakpakova, 1966).

ERGEBNISSE

1. CHROMOSOMEN-SPIRALBILDUNG MIT IN EINEN STRANG DES DNS-MOLEKÜLS INKORPORIERTER BUdR

a) Chromosomen-Morphologie

Auf BUdR ansprechende Chromosomen waren durch ungleiche Spiralbildung der Längsseite entlang gekennzeichnet, wodurch sie ein segmentiertes Aussehen hatten. Dies wurde durch das Auftreten verlängerter Regionen verschiedener Größe verursacht. In beiden untersuchten Zellreihen wurden besonders ausgeprägte verlängerte Regionen in zwei Geschlechtschromosomen und drei Markierern beobachtet, die die größten spät replizierenden Segmente hatten (Bilder 1 bis 4). Außerdem konnten einige andere Chromosomen des Satzes reagieren, wenn auch mit geringerer Regelmäßigkeit und Ausgeprägtheit (Bild 2). Die segmentierten Chromosomen fanden sich im allgemeinen in mehr als 50% der Metaphasen, wobei alle fünf Chromosomen konstante Segmentierung zeigten.

Das Segmentierungsmuster war für eine gegebene Chromosomenvariation konstant, was in der Hauptsache auf die Größe der verlängerten und zusammengezogenen Segmente zurückgeht, das heißt auf den Grad der Verzögerung in der Spiralbildung (Bild 3, 4). Chromosomenregionen mit verzögerter Spiralbildung variierten in der Größe zwischen schwachen Zusammenziehungen und ziemlich verlängerten Segmenten. Je länger diese Regionen sind, umso kleiner erscheinen die benachbarten zusammengezogenen Segmente. Ein Vergleich des durch BUdR hervorgerufenen Segmentationsmusters mit der Chronologie der DNS-Replikation entlang den Chromosomen und/oder mit dem Segmentationsmuster, das unter dem Einfluß von Colcemid beobachtet wird (Zakharov und Egolina, 1968, 1969) zeigt, daß die verlängerten Regionen denjenigen mit spät replizierender DNS gut entsprechen (Bilder 2 - 4). Damit kann man das Auftreten der äußerst regelmäßigen und ausgeprägten Segmentation in Chromosomen mit klar ausgedrückten spät replizierenden Segmenten

erklären. BUdR- und Colcemid-Behandlung unterscheiden sich weder in der Zahl der induzierten Hauptsegmente noch in ihrer Lage. Diese Ähnlichkeit des Segmentierungsmusters wird durch die quantitative Bestimmung der durch die beiden Wirkstoffe hervorgerufenen Lokalisierung der spiralisierten Segmente bestätigt. Die Lage eines jeden Segments wird durch die Entfernung zwischen seinem Mittelpunkt und dem Zentromer beschrieben, ausgedrückt in Prozent der gesamten segmentierten Armlänge. Chromosomen, die mit Colcemid behandelt wurden, unterschieden sich etwas in längeren verlängerten und kürzeren zusammengezogenen Segmenten. Dies erklärt die systematische Verlagerung der Segmentlage bei mit Colcemid behandelten Chromosomen im Vergleich zu dem Bild, das sich bei BUdR ergibt.

Versuche mit Tritium-markiertem BUdR bestätigen zusätzlich die Existenz der Korrelation zwischen Chromosomenregionen, die unter dem Einfluß von BUdR verlängert sind, und spät replizierenden. Das markierte Analogon, das zu Ende der S-Periode unmittelbar nach der Behandlung mit nicht markiertem BUdR verwendet wurde (siehe Materialien und Methoden), ist ausschließlich in den verlängerten Chromosomen-Regionen lokalisiert. Die spiralisierten Chromosomen-Regionen ohne BUdR-Inkorporierung sind genau diejenigen, bei denen DNS frühzeitig in der S-Periode replizierte.

b) Abhängigkeit des BUdR-Effektes von der Konzentration
und der Einwirkungszeit im mitotischen Zyklus

Verschiedene Dosen von BUdR riefen einen verschiedenartigen Effekt hervor, der in direktem Zusammenhang mit der verwendeten Dosierung stand, wie dies in zwei unabhängigen Versuchen herausgefunden wurde. Bei allen verwendeten Dosen gab es Metaphasen mit segmentierten Chromosomen, deren Zahl ganz deutlich mit erhöhter Konzentration anstieg. In einer Dosis von 200 bis 400 $\mu\text{g/ml}$, rief BUdR in mehr als 50% der Metaphasen eine Segmentierung hervor. Bei erhöhter Konzentration wurde die Segmentierung deutlicher: Die verlängerten Segmente waren länger, und die zusammengezogenen Segmente waren kürzer.

Die Untersuchung der Korrelation zwischen dem Teil der S-Periode, in dem BUdR verabreicht wurde, und der Spiralbildungsverzögerung zeigte, daß diese Auswirkung vollständig von dem Zeitintervall vom Einsetzen der BUdR-Wirkung zur Mitose bedingt wird. Um den möglichen Einfluß von BUdR auf die Dauer des mitotischen Zyklus und seine Phasen zu berücksichtigen, wurde der Versuch so durchgeführt, daß Informationen über den zeitlichen Ablauf der Phasen des mitotischen Zyklus unter Behandlung erlangt wurden. BUdR wurde den Kulturen (Klon 237) in einer Konzentration von 200 ug/ml eine Stunde lang zugegeben. Die Kulturen wurden mit Eagle's Medium gewaschen und eine Stunde später 15 Minuten lang 1 uC/ml ^3H -Thymidin ausgesetzt (spezifische Aktivität 8,6 C/mM, Radiochemical Center, Amersham, England). Nach Waschen mit Earle's Salzlösung, die mit 10 ug/ml Thymidin angereicht war, wurden der Kultur über einen Gesamtzeitraum von 25 Stunden Proben entnommen, um die Anwesenheit markierter Metaphasen aufzuzeichnen. Es ergaben sich keine Unterschiede in der Gesamtdauer des mitotischen Zyklus und der Dauer seiner Phasen zwischen Zellen unter BUdR-Behandlung und den kontrollierenden ($T = 11 - 12$ Stunden; $t_{G_1} + M = 1,5 - 2$ Stunden; $t_S = 8 - 9$ Stunden. $t_{G_2} = 1,0$ bis 1,5 Stunden).

Die Abhängigkeit des Prozentsatzes der Zellen mit segmentierten Chromosomen von der Zeitpanne zwischen der BUdR-Einführung und der Zellfestigung wird in Bild 10 dargestellt. Verschiedene Punkte auf der Kurve beziehen sich auf Zellen, die in verschiedenen Teilen der S-Periode zur Zeit der BUdR-Einwirkung liegen, das heißt auf Zellen, bei denen BUdR in verschiedene Chromosomen-Regionen inkorporiert ist: je länger der Zeitraum bis zur Mitose ist, desto früher inkorporieren replizierende Chromosomen-Regionen das Analogon.

Die Höchstzahl von Zellen mit segmentierten Chromosomen wurde bei Proben beobachtet, die 3 Stunden nach Beginn der BUdR-Einwirkung entnommen wurden, was dem Ende der S-Periode

entspricht. Die Kurven zeigen, daß die Zahl von Zellen mit segmentierten Chromosomen bei längeren Festigungszeiten abnahm. Nicht eine einzige derartige Zelle wurde gefunden, wenn BUdR 8 Stunden vor der Mitose inkorporiert worden war, das heißt zu Beginn der S-Periode, obgleich das Analogon aktiv in das Chromosom inkorporiert war, wie dies durch die intensive Markierung früh replizierender Chromosomen-Segmente mit ^3H -BUdR gezeigt wird. Daher wird die zytologische Auswirkung der BUdR-Behandlung, die sich in dem Auftreten unterspiralisierter Regionen entlang einem Chromosom zeigt, nicht nur von der Analogdosis, sondern auch durch die Länge des Zeitabschnittes zwischen der BUdR-Inkorporierung und der Mitose bestimmt. Diese Wirkung ist der Länge der Zeit umgekehrt proportional und ist daher nur bei spät replizierenden Chromosomenregionen zu beobachten.

2. CHROMOSOMEN-SPIRALBILDUNG BEI INKORPORIERUNG VON BUdR IN BEIDE STRANGE DER DNS-MOLEKULE

Die beschriebenen Beobachtungen verleiten zu der Annahme, daß die Inkorporierung von BUdR in beide komplementären Stränge des chromosomen DNS-Moleküls Chromosomen-Spiralbildung intensiver verzögere und feinere morphologische Einzelheiten erbringe. Nach zwei Replikationszyklen bei Anwesenheit von BUdR ist eine derartige Inkorporierung lediglich für einen der zwei Schwesterchromatide möglich. Daher kann man erwarten, eine ausgeprägtere Spiralbildungsverzögerung nur in einem Schwesterchromatid zu beobachten. Solche Daten wären ein zusätzlicher Beweis für die Verbindung zwischen dem zytologischen Effekt des BUdR und seiner Inkorporierung in das DNS-Molekül.

Aus den erwähnten Betrachtungen ergaben sich Versuche, die darauf abzielten, das Spiralbildungsmuster entlang Chromosomen nach ihrer Reproduzierung in Anwesenheit von BUdR in zwei aufeinanderfolgenden mitotischen Zyklen zu untersuchen.

a) Ungleiche Spiralbildungsverzögerung bei
Schwesterchromatiden

Die Analyse von Metaphasen, die unter BUdR nur während des ersten Zyklus replizierten, ergab, daß die meisten Zellen die Substanz inkorporiert hatten: 60 bis 90% der Metaphasen hatten segmentierte Chromosomen (Tabelle 1).

Tabelle 1: Prozentsatz der Metaphasen mit Chromosomen-spiralbildungsverzögerung nach BUdR-Behandlung in einem oder zwei aufeinanderfolgenden mitotischen Zyklen ^a.

Experiment Nr.	Zyklus	Spiralisationsverzögerung bei Schwesterchromatiden		
		ungleich	gleich	nicht vorhanden
1	Erster	0	86	14
2		0	90	10
3		0	60	40
1	Zweiter	75	12	13
2		49	12	39

^aIm ersten Zyklus wurden 50 Metaphasen bei jedem Versuch analysiert; im zweiten Versuch 100 Metaphasen.

Wenn in Betracht gezogen wird, daß nicht alle Zellen BUdR im ersten Zyklus inkorporierten, und daß die Synchronisierung der Zellteilung im zweiten Zyklus relativ ist, so müssen die teilenden Zellen in der zweiten Mitose nach zwei Reproduktionen bei Anwesenheit von BUdR in vier Variationen dargestellt werden: a) Zellen, die BUdR in beiden Zyklen inkorporiert; b) Zellen, die BUdR entweder nur in dem ersten Zyklus oder c) in dem zweiten Zyklus inkorporiert haben; b) Zellen, die kein BUdR aufweisen. Wenn die Verzögerung in der Chromosomen-Spiralbildung tatsächlich mit der Inkorporierung von BUdR in das DNS-Molekül in Verbindung steht, so sollten sämtliche Metaphasen des zweiten Zyklus durch drei mor-

phologische Typen dargestellt werden. Zellen, die den Wirkstoff zweimal in ein Chromatid und einmal in das andere inkorporierten, würden einen Unterschied in der Morphologie von Schwesterchromatiden zeigen; Zellen, die BUdR nur im zweiten Zyklus inkorporieren, hätten eine ähnliche Spiralbildungsverzögerung bei beiden Chromatiden und Chromosomen, die den Wirkstoff in keinem Zyklus annehmen oder ihn nur im ersten inkorporieren, hätten eine Morphologie von gewöhnlichen Metaphasen-Chromosomen.

Die Analyse der Metaphasen in der zweiten Abteilung bestätigte in der Tat das Vorhandensein aller drei vorgeschlagenen morphologischen Varianten (siehe Tabelle 1). Eine Anzahl von Metaphasen bestand aus Zellen mit verzögerter Spiralbildung, die auf ähnliche Weise in beiden Schwesterchromatiden ausgedrückt war und aus solchen mit normal spiralisierten Chromosomen. In einer großen Zahl der Metaphasen (38 bis 75%) wurde eine ungleiche Spiralbildung von Schwesterchromatiden beobachtet. Dieser Effekt sowie ein Segmentierungseffekt nach einfacher Chromosomenreproduzierung unter BUdR wurde nur von Chromosomen gezeigt, die große spät replizierende Regionen haben, nämlich von den Geschlechts- und den Markierer-subtelozentrischen Chromosomen. Die Auswirkung wurde nie beobachtet, wenn sie lediglich im ersten Zyklus dem BUdR ausgesetzt waren. Die Segmentierung, die sich durch die doppelte BUdR-Inkorporierung ergab, beeinflusste alle fünf Chromosomen in dem Karyotyp.

Die zytologische Wirkung der doppelten BUdR-Inkorporierung drückte sich durch eine starke Verzögerung der Spiralisierung in einer der beiden Schwesterchromatiden aus, obgleich das Hauptsegmentationsmuster das gleiche war. Manchmal erschien das Chromatid als ein schwach gefärbter Faden, was auf unklare Grenzen zwischen zusammengezogenen und verlängerten Segmenten zurückzuführen war.

Das zweite Chromatid in einem solchen Chromosom war entweder auch segmentiert, jedoch immer in geringerem Grade, oder erschien als normal spiralisiert. Der letztere Fall kann zur vollen Zufriedenheit durch den Übergangscharakter der BUdR-Spiralbildungsverzögerung erklärt werden: Wenn BUdR in einen DNS-Strang inkorporiert ist, ist diese Verzögerung bereits kompensiert. Der verschiedene Grad der Spiralbildungsverzögerung in Schwesterchromatiden hat es ermöglicht, nicht selten Schwesterchromatidaustausche zu beobachten. Daher zeigt das analysierte Material ganz offensichtlich die Existenz von drei morphologischen Varianten von Chromosomen, was der vorgebrachten Annahme voll und ganz entspricht.

b) BUdR-Verteilung in ungleich spiralisierten Schwesterchromatiden

Die Interpretierung der beobachteten Erscheinung als doppelte Inkorporierung von BUdR in ein Chromatid mit stärkerer Verzögerung bei der Spiralbildung schien tatsächlich jedoch nicht offensichtlich zu sein. Um diese Annahme zu überprüfen, wurde die Verteilung von mit Tritium behandeltem BUdR über Chromatide mit ungleicher Spiralbildung autoradiographisch analysiert. Das Analogon wird in das DNS-Molekül während der Chromosomen-Reproduktion inkorporiert. Daher muß das BUdR, wenn es im ersten Zyklus eingeführt und im zweiten aufgezeichnet wird, nur in einem stärker verlängerten Chromatid liegen, vorausgesetzt, daß die Annahme über die doppelte BUdR-Inkorporierung in ein stärker verlängertes Chromatid richtig ist. BUdR, das in dem zweiten Zyklus inkorporiert und aufgezeichnet wird, muß sich gleichfalls in beiden Chromatiden zeigen, ohne Rücksicht auf ihren morphologischen Unterschied. Es zeigt sich, daß die autoradiographischen Muster der Markierungsverteilung nach der ^3H -BUdR-Inkorporierung, und zwar getrennt in dem ersten und dem zweiten Zyklus und aufgezeichnet im zweiten. Nach dem vorgebrachten Konzept war die Markierung nach Einführung des markierten Analogons im ersten Zyklus und seiner Analyse in dem zweiten Zyklus,

lediglich in einem Chromatid vorhanden. Das markierte Chromatid war genau dasjenige, das eine stärkere Spiralbildungsverzögerung aufwies. Die Inkorporierung des BUdR im zweiten Zyklus resultiert in einer Markierung beider Chromatide. Die Markierung war gleichmäßig in beiden Chromatiden verteilt, ohne Rücksicht auf den Unterschied in ihrer Spiralbildung. Das bedeutet, daß das stärker verlängerte Chromatid die Markierung in beiden Zyklen enthielt, das heißt, es enthält BUdR in beiden komplementären Strängen des DNS-Moleküls.

DISKUSSION

Ogbleich BUdR ein gut beschriebenes und oft verwendetes Mutagen ist, kann man in der Literatur nur schwerlich eine Beschreibung finden, die sich auf seinen Einfluß auf Chromosomen bezieht, wenn es am Ende der S-Periode verwendet und seine Auswirkung in der ersten Mitose aufgezeichnet wurde; Ausnahmen sind die Veröffentlichungen von Palmer (Palmer und Funderburk, 1965; Palmer, 1968, 1970). Sie beobachtete eine erhöhte Zahl und eine Verstärkung von sekundären Konstriktionen bei menschlichen Chromosomen nach der Anwendung von BUdR kurz vor der Mitose. In anderen zytogenetischen Untersuchungen wird BUdR bei Verabreichung an Zellkulturen in kleinen Dosen von 5 bis 25 ug/ml während eines Zeitraumes von vielen Stunden bis zu einigen Tagen so dargestellt, als daß es während des größten Teiles eines mitotischen Zyklus oder sogar während mehreren Zyklen aktiv gewesen ist (Hsu und Somers, 1961; Ho und andere, 1963, Kaback und andere, 1964, Huang, 1967; Engel und andere, 1967). Unter solchen Bedingungen waren Chromosomenänderungen nicht so sehr als Verstärkung sekundärer Konstriktionen als in der Erscheinung von Spalten und Brüchen, hauptsächlich in heterochromatischen Regionen, ausgedrückt.

Wir haben die chromosomale Wirkung der Inkorporierung dieses Analogons von Thymidin in spät replizierende Chromosomen-Regionen untersucht, wobei wir die Wirkung in der allerersten

Mitose geprüft haben; die Zeit, während welcher die Zellen dem BUdR ausgesetzt waren, war dabei auf 1 bis 2 Stunden verringert. Unter diesen Bedingungen zeigte sich die Wirkung des BUdR fast ausschließlich in einer Unterspiralbildung von Chromosomen-Regionen, die sich in seiner Anwesenheit replizierten, das heißt von spät replizierenden. Die Häufigkeit von Chromosomen-Abweichungen war sehr gering, selbst bei hohen Konzentrationen des Wirkstoffes, und sie lagen oft in verlängerten Chromosomen-Regionen. Die Wirkung wurde bei erhöhter BUdR-Konzentration erhöht und war der Zeitspanne von dem Zeitpunkt seiner Inkorporierung (DNS-Synthese) bis zur Mitose umgekehrt proportional. Sie kann daher nur in Chromosomen festgestellt werden, die spät replizierende DNS haben.

Es erhebt sich die Frage nach dem Mechanismus und der Art der beschriebenen Erscheinung. Wir interpretieren sie als eine Verzögerung der mitotischen Spiralbildung in Chromosomenregionen, bei denen eine Reduplizierung in Anwesenheit von BUdR vorgeht. Um diese Erscheinung richtig erklären zu können, muß die Identität der morphologischen Muster der gleichen Chromosomen betrachtet werden, wenn Zellen mit so verschiedenen Wirkstoffen wie BUdR und Colcemid behandelt wurden (Zakharov und Egolina, 1968, 1968).

Die Längsdifferenzierung, die sich in beiden Fällen zeigt, ist offensichtlich in der Chromosomenstruktur vorgeformt. Die verwendeten Wirkstoffe tragen lediglich dazu bei, diese strukturelle Differenzierung sichtbar zu machen. Unsere vorausgegangenen Experimente mit Colcemid zeigten, daß das morphologische Differenzierungsmuster vollständig mit der Chronologie der DNS-Replizierung entlang einem gegebenen Chromosom zusammenfällt. Die gleiche Wechselbeziehung wird nun für die durch BUdR verursachte Differenzierung aufgestellt. Diese Wechselbeziehung wird höchst zufriedenstellend durch die in der Einleitung vorgebrachte Hypothese erklärt, nämlich:

- a) Chromosomenreduplikation und Spiralbildung sind Funktionen, die im Hinblick auf die Zeit eng miteinander verbunden sind;
- b) Chromosomen-Segmente können beide Erscheinungen relativ autonom zustandebringen, das heißt unabhängig von anderen;
- c) die Verzögerung einer Chromosomen-Region bei der Reduplizierung kann eine Verzögerung davon bei der mitotischen Spiralbildung verursachen. Daher darf man folgern, daß die morphologische Differenzierung eines Chromosoms entlang seiner Länge, die durch die Asynchronie der Spiralbildung von Chromosomen-Segmenten verursacht ist, eine Differenzierung der DNS-Replizierung und vielleicht genetische Aktivität widerspiegelt.

Im Lichte dieser Annahme kann man eine große Gruppe von Beobachtungen, die in der Literatur unabhängig voneinander berichtet werden, zufriedenstellend erklären.

Reguläre sekundäre Einschnürungen (mit Ausnahme derjenigen, die zur Formierung des Nukleolus beitragen) und Chromosomen-Regionen mit chromatider Auflagerung können als das Ergebnis spontaner, "physiologischer" Spiralbildungsverzögerung in den zuletzt replizierenden Chromosomen-Regionen interpretiert werden. Auf dieser Grundlage kann man mühelos die Ähnlichkeit der beiden vorher unterstellten Erscheinungen (Schmid, 1967) und der späten DNS-Replikation in diesen Regionen erklären. Viele beschriebene Fälle von "spontaner" Erhöhung regulärer sekundärer Einschnürungen, des Auftretens neuer Zusammenschnürungen, "unvollständiger Zusammenziehung" von Chromosomenmaterial bis zu seiner "Pulverisierung" (Miles, O'Neil, 1966; zur Hausen, 1967; Miles et al., 1968; German, 1969; Huan et al., 1969; Patau, 1971) können wohl als das Ergebnis einer Zeitverschiebung bei der Reduplizierung der entsprechenden Chromosomenregionen oder ganzer Chromosomen aus der synthetischen Phase hinaus betrachtet werden. So kann man

der Annahme einer einzigen Art aller dieser Erscheinungen (Miles und O'Neil, 1969) leicht zustimmen. Schließlich erklärt diese Annahme recht zufriedenstellend die Verstärkung der regulären sekundären Einschnürungen, das Auftreten neuer Einschnürungen und die Pulverisierung von Chromosomen-Material, die unter der Einwirkung verschiedener Chemikalien beobachtet wurden (Hsu und Somers, 1961; Kihlman und andere, 1963; Bell und Wolff, 1964; Kaback und andere, 1964; Cohen und Shaw, 1964; Kurita und andere, 1965; Palmer und Funderburk, 1965; Fucik und andere, 1970) sowie einiger Viren (Moorhead und Saksela, 1963; Wolman und andere, 1964; Nichols, 1964; O'Neils und Miles, 1969; Nichols, 1970; Sandberg und andere, 1970).

Die vorgebrachte Annahme kann als theoretische Basis für die Entwicklung einer Methode betrachtet werden, die eine funktionelle Differenzierung entlang mitotischer Chromosomen durch die Beeinflussung der Chromosomen-Spiralbildung zeigen könnte. Im allgemeinen sollte dieser Einfluß eine Spiralbildungsverzögerung in Chromosomen-Regionen durch die vorübergehende Hemmung der DNS-Synthese in diesen Regionen oder durch die Hemmung der Protein-Synthese hemmen, die zu der Zusammenziehung des Chromosomenfadens beiträgt.

Die Daten über die Chromosomenwirkung des BUdR, die in dieser Abhandlung vorgebracht werden, gestatten es, gewisse Behauptungen über seinen Mechanismus in der Hoffnung aufzustellen, daß sie die Suche nach Mischungen erleichtern, die die erforderliche Wirkung abgeben. Aus unseren Daten ergibt sich das folgende:

- a) Die Spiralbildungsverzögerung findet nur in Chromosomen-Regionen statt, die in Gegenwart des Thymidin-Analogons replizieren.
- b) Die Spiralbildungsverzögerung ist im Bereich hoher Konzentrationen des Analogons streng von der Dosis abhängig.

- c) Die Spiralbildungsverzögerung hat einen vorübergehenden Charakter und ist der Zeitspanne umgekehrt proportional, die zwischen der BUdR-Inkorporierung und der Mitose liegt.

Darüberhinaus wird eine entsprechende Chromosomen-Region, die den Wirkstoff enthält, trotz des vorübergehenden Charakters der BUdR-Wirkung der wiederholten Einwirkung zugänglicher. Diese Daten ermöglichen es uns, zumindest einen doppelten molekularen Mechanismus des beobachteten Chromosomen-Effektes anzunehmen. Der erste tritt folgendermaßen auf: Es ist bekannt, daß BUdR, das ein Thymidin-Analogon ist, in ein DNS-Molekül während seiner Replizierung eingeschlossen ist. Der Ersatz der Methylgruppe in dem Thymidin durch ein Bromatom, was in der DNS in diesem Falle auftritt, zieht eine Reihe physikalisch-chemischer Änderungen in dem DNS-Molekül nach sich (Szybalski, 1962), wodurch sich Schwierigkeiten bei der Bildung der Sekundärstruktur ergeben. Die Darstellung dieser Auswirkung auf Chromosomen-Ebene steht möglicherweise mit einer Störung der Synthese einer Proteinkomponenten des Chromosoms in Zusammenhang, die sich in der Spiralbildungsverzögerung spät replizierender Chromosomen-Regionen ausdrückt. Die größere Unterzusammenziehung eines Chromatids, dessen DNS-Molekül in einem seiner Stränge früher inkorporiertes BUdR aufwies, kann gerade durch diesen Mechanismus zufriedenstellend erklärt werden. Unseres Wissens werden in der Literatur nur zwei Beobachtungen hinsichtlich der ungleichen Reaktion von Schwesterchromatiden des oben erwähnten Typs auf Mutagene berichtet (Huang, 1967; Kato, 1968). Die Beobachtungen waren nicht erklärt worden. Die hier vorgestellten Daten gestatten es, diese Erscheinung in einen Zusammenhang mit der ungleichen Nummer von DNS-Strängen zu bringen, die durch das Mutagen in Schwesterchromatiden beeinflußt werden.

Die steigende Erhöhung der zytologischen Wirkung, die bei gesteigerter Konzentration des Wirkstoffes beobachtet wird, kann nur schwerlich durch einen einfachen gleichlaufenden Er-

satz für Thymidin erklärt werden, da selbst die Mindestdosis von 25 $\mu\text{g/ml}$, die bei unseren Experimenten benutzt wurde, hoch genug war, um den Thymin-Ersatz durch Bromouracil sicherzustellen (Szybalski, 1962).

Man kann daher annehmen, daß BUdR in hohen Konzentrationen auch als allosterischer Inhibitor wirkt (Monod und Jacob, 1961; Prusoff, 1968) und bei allosterischen Enzymen eingreift, die bei DNS teilnehmen und/oder bei der Proteinsynthese und dadurch diese synthetischen Aktivitäten hemmt. Der vorübergehende Charakter der Spiralbildungsverzögerung wird durch die Umkehrbarkeit der allosterischen Wirkungen gut erklärt.

Als ein möglicher dritter Mechanismus, der für die BUdR-Wirkung auf Chromosomen-Ebene verantwortlich ist, kann man die interessanten Beobachtungen erwähnen, die in diesem Institut (Leykina E.M., unveröffentlichte Daten) über den Einfluß halogen behandelter Nukleoside auf die supermolekulare Organisation von Zellchromatin gemacht worden sind. Für diese Daten sind jedoch noch weitere Versuche erforderlich.

Die Daten über den Mechanismus der BUdR-Tätigkeit gestatten es, Analoge von Nukleosiden und Nukleotiden als das Ziel einer weiteren Suche nach chemischen Wirkstoffen zu bezeichnen, die in der Lage sind, die Spiralbildung spät replizierender Chromosomen-Regionen selektiv zu hemmen. Die Richtigkeit dieser Annahme wird durch die Entdeckung einer solchen Fähigkeit im Falle von 5-Azacytydin und 5-Azadeoxycytidin (Fucik und andere, 1970) bewiesen, sowohl wie im Falle von 6-Thioguanin (Egolina, unveröffentlichte Daten).

2.10 DIE DIFFERENTIAL-REAKTIVITÄT VON MENSCHLICHEN
PERIPHEREN LEUKOZYT-CHROMOSOMEN, DIE DURCH NIE-
DRIGE TEMPERATUR INDUZIERT WURDEN

Von Yukimasa Shiraishi

Erhalten am 17. September 1970

Es ist seit langem bekannt, daß sich teilende Kerne Chromosomen-Segmente hervorbringen, welche in einer Anzahl von Organismen verringerte Durchmesser und eine reduzierte Färbbarkeit haben. Darlington und La Cour (1938) nannten diese Reaktion die Differential-Reaktivität von Chromosomen. Die Anzahl, die Größe und die Position der speziellen Segmente von behandelten Chromosomen sind für ein gegebenes Chromosom fest begrenzt und konstant, das heißt, daß bestimmte spezifische Regionen von spezifischen Chromosomen in bezug auf den Rest schwächer gefärbt sind (Darlington und La Cour, 1938, 1940, 1941; Wilson und Boothroyd 1941, 1944; Haga 1944, Haga und Kurabayashi 1953, 1954).

Darlington und La Cour (1941) nahmen an, daß die durch Kältebehandlung induzierten Zusammenziehungen heterochromatisch sind mit einer reduzierten Menge von Nukleinsäure als Ergebnis der Kälteaushungerung. Wilson und Botthroyd (1944) waren der Ansicht, daß die induzierten Zusammenziehungen die Produkte unvollständiger Spiralbildungen seien, obwohl sie die Möglichkeit nicht ausschlossen, daß DNA-Metabolie an diesen Stellen getrennt sein könnte. Unter Verwendung von mikrophotometrischen Messungen konnten Woodard und Swift (1964) keine verringerten Mengen von Nukleinsäure in den Segmenten, die durch Kälte sichtbar gemacht wurden, feststellen, noch eine nach der Behandlung stattfindende Aufnahme von mit Tritium behandeltem Thymidin. Sie nahmen an, daß infolge der Kälteeinwirkung ein lokalisiertes Sichloswickeln von Chromosomensegmenten stattfindet.

Andererseits bestätigten Haga und Kurabayashi (1953), daß die Differenzierung von spezifischen Chromosomensegmenten durch Kältebehandlung progressiv fortschreitet von normaler Färbung zum schwach gefärbten und gestreckten Zustand, und daß die endgültige Differenzierung eines Chromosoms ein Muster bildet, welches für ein gegebenes Chromosom spezifisch und konstant ist.

Callan (1942) beobachtete bei Tieren, daß die heterochromatischen Segmente als Zusammenziehungen erschienen, und zwar nach Kältebehandlung in Triton behandelten Mitose-Chromosomen. Koller berichtete 1946 über ein Differentialsegment von Heterochromatin am X-Chromosom des Hamsters, *Cricetus auratus*, und führte dies zurück auf winterliche Bedingungen (anoestrus), Unterernährung, Krankheit und Alter, wodurch die Differentialreaktivität von Chromosomsegmenten physiologisch bedingt war. Hampel und Levan berichteten 1964, daß durch Behandlung mit niedrigerer Temperatur viele Chromosomenbrüche induziert wurden in menschlichen Fällen, und zwar in den Linien Lu 106 und HEL.

Das Studium von sekundären Zusammenziehungen in menschlichen somatischen Chromosomen wurde durchgeführt, um individuelle Chromosomen zu identifizieren, da dies für die Morphologie nützlich ist (Ferguson-Smith et al. 1962; Saksela und Moorhead 1962 und Sasaki und Makino 1963). Weitere in die Einzelheiten gehende morphologische Kriterien zur Identifikation von individuellen Chromosomen sind jedoch noch zu finden.

Die Wichtigkeit dieser Kriterien hat bei den Zytologen ein Interesse erweckt in bezug auf die Charakteristiken jedes Chromosoms in seinen komplementären Gegenstücken. Der Zweck dieser vorliegenden Studie ist es, den detaillierten Kerntyp zu bestimmen, und zwar gestützt auf die Differentialreaktivitäten menschlicher Chromosomen, die durch die niedrige Temperatur induziert wurden.

MATERIALIEN UND METHODEN

Als Material für die vorliegende Studie wurden menschliche periphere Leukozyten einer normalen Frau verwendet. Die Leukozyten wurden nach der üblichen Phytohämagglutinin-Methode kultiviert (Moorhead und andere 1960). Mit der gesamten Blutkultur wurden Experimente durchgeführt, wofür ein Milliliter peripheren Blutes benutzt wurde, welches in "Eagle's Minimal Essential Medium" kultiviert war und 20% Fötalserum vom Kalb enthielt. In jede 250 ml-Flasche wurden 10 ml des Mediums eingegeben, dazu 0,1 ml Burrough Wellcome Phytohämagglutinin und 1 ml des gesamten Blutes. Kontrollkulturen wurden bei 37°C 72 Stunden lang ausgebrütet. Die Zellen wurden dann sogleich in eine Zentrifugalaröhre übertragen und in einer positiven Tyrode-Lösung gewaschen, welcher die dreifache Menge an destilliertem Wasser beigegeben war. Nach 15 Minuten wurden die Zellen zentrifugiert und die sich abgesetzten Teile wurden fixiert in einem absoluten Athanol-Essigsäure-Gemisch im Verhältnis 3 : 1. Durch Trocknen an der Luft wurden Glasbilder hergestellt, und die Präparate wurden im wesentlichen nach der Methode nach Moorhead und anderen (1960) behandelt. Die Glasbilder wurden gefärbt nach der leicht veränderten Reaktionsmethode, und zwar mit Silberhexamethylentetramin, jedoch wurde in der vorliegenden Studie die Behandlung mit einer wässrigen Lösung aus 0,2% Gold-Chlorid ausgelassen. Die beste Zeit für die Hydrolyse mit warmem IN HCl betrug 6,30 Minuten bei 60°C. Die geeignete Einfärbzeit für das Chromosompräparat betrug 12 Stunden bei 40 bis 45°C, wobei die Einfärbblösung alle 4 Stunden erneuert wurde.

Zum anderen wurden die Leukozytkulturen, die bei 37°C in der Zeit von 48 Stunden hergestellt wurden, mit niedriger Temperatur behandelt, indem sie 24 Stunden lang in einem elektrischen Kühlschrank bei einer Temperatur von 0 bis 3°C aufbewahrt wurden. Das technische Verfahren zur Herstellung der Präparate war dasselbe wie das Verfahren für die Kontrollkulturen. In keinem der beiden Fälle wurde eine Kolchizin-Behandlung durchgeführt.

Für die detaillierte Zelltyp-Analyse wurden in jedem Fall 45 gut verteilte Metaphase-Chromosomen beobachtet. Mit Hilfe des Olympus-Mikroskopes und einer angeschlossenen Nikon M-35 S-Kamera wurden die Metaphase-Chromosomen fotografiert, die Vergrößerung durch das Mikroskop betrug 700. Das Abmessen der Längen spezieller Segmente oder Zusammenziehungen, induziert durch niedrige Temperatur, wurden durch stark vergrößerte fotomikrografische Abzüge ermöglicht, ungefähre Vergrößerung 3000.

RESULTATE

Die Verteilung der Anzahl der Chromosomen in der Metaphase, die sowohl an der Kontrollkultur als auch in den behandelten Zellen beobachtet wurde, ist in Tabelle 1 wiedergegeben. In beiden Fällen erwies sich, daß 46 Chromosomen das Maximum der mitotischen Metaphasen war. Aber im Erscheinungsbild waren die behandelten Chromosomen auffallend verschieden von denjenigen in der Kontrollkultur. Die Sekundär-Zusammenziehung wurde lediglich in der Mitte des kurzen Armes von Chromosom 6 beobachtet. Dagegen zeigten die behandelten Zellen klare Merkmale in ihren Chromosomen, wobei stark gefärbte Segmente abwechselten mit Segmenten, die fast gar keine Färbung aufwiesen und als Zusammenziehungen erschienen. Gefärbte und ungefärbte Regionen folgten einander in regelmäßiger Reihenfolge entlang der gesamten Länge des Chromosoms. Solche Chromosomen wurden fast garnicht in der Kontrollkultur beobachtet, weshalb dies als unzweifelhaftes Ergebnis der Differentialreaktivitäten erkannt wurde, induziert durch Behandlung mit niedriger Temperatur, (Tabelle 2). Die Orte spezieller Segmente, die in einer oder in beiden homologen Regionen von homologen Chromosomen erschienen, wurden mit der relativen Entfernung vom Zentromer gemessen. Die Orte spezieller Segmente in beiden der homologen Chromosomen wurden vom Autor im langen Arm mit a, b, ... bezeichnet, im kurzen Arm mit a', b' Jedes dargestellte Segment ist zusammengesetzt aus einem oder mehreren kleinen Segmenten.

Es wurde herausgefunden, daß die Frequenzen spezieller Segmente in den Chromosomen der Gruppen A, B, C und D erheblich höher waren nach der Behandlung mit niedriger Temperatur als in den Kontrollkulturen. Die speziellen Segmente konnten in beiden homologen Chromosomen öfter beobachtet werden, als in nur einem von homologen Chromosomen, und allgemein waren die Frequenzen der Segmente im langen Arm höher als in den kurzen Armen. Die Segmente in beiden Armen waren mit einer gewissen Regelmäßigkeit, nicht auf Gerätewohl, entlang den einzelnen Chromosomen verteilt, und die Segmente waren fast garnicht an den Endpunkten der Chromosomenarme sowie in den Gebieten beim Zentromer zu sehen.

Das Chromosom Nr. 1 zeigte acht gesonderte Segmente in beiden der homologen Chromosome. Von diesen Segmenten wurden die drei Segmente in dem langen Arm bei Position, a, c und d und die beiden im kurzen Arm bei Position 1-a; und 1-b; mit einer verhältnismäßig höheren Frequenz von über 30% beobachtet. Das Segment 1-c, welches aus vier kleineren Segmenten bestand, wurde unter den acht Segmenten häufiger beobachtet (70%). Das Chromosom Nr. 2 zeigte sechs gesonderte Segmente von verschiedener Länge und prominente gesonderte Segmente wurden bei Position 2-b, 2-c und 2-b' beobachtet. Das Segment 2-c, welches aus drei kleineren Segmenten bestand, wurde unter den sechs Segmenten häufiger beobachtet (60%). Das Chromosom Nr. 3 zeigte zwei Spezialsegmente bei Position 3-a und 3-a'. Dieses Chromosom zeigte die geringste Anzahl der Häufigkeit gesonderter Segmente innerhalb der A-Gruppe. Bei den Chromosomen der B-Gruppe zeigte die Nr. 4 fünf gesonderte Segmente und die Nr. 5 vier Segmente. In den beiden Chromosomen Nr. 4 und Nr. 5 wurden die Segmente häufig beobachtet, welche nahe dem Zentromer in jedem langen Arm auftraten, obwohl sie nur in einem der homologen Chromosomen vorkamen.

Die Chromosomen Nr. 6 bis 12 + X in der C-Gruppe werden gewöhnlich als diejenigen bezeichnet, die schwer zu identifizieren sind, besonders in Geschlechtschromosomen. Diejenigen Chromosomen, welche mittlere Längen zwischen der Nr. 6 und der Nr. 7 zeigten, wurden in dieser Studie als Chromosom Nr. 6' bezeichnet, und von diesen Chromosomen hatte man oft angenommen, daß sie die X-Chromosome seien. Das Chromosom Nr. 6' zeigte die Eigenschaften ihrer Segmental-Muster. Vier gesonderte Segmente wurden dargestellt, und zwei von ihnen (6'-a und 6'-b) waren in der Häufigkeit vorherrschend (60 bis 704). Deshalb war das Chromosom Nr. 6' klar von den anderen Chromosomen in der C-Gruppe zu unterscheiden. Diese Chromosomen zeigten zwei von drei markierten Segmenten im langen Arm, abgesehen von der Nr. 10 und ein oder zwei anderen etwa in der Mitte des kurzen Armes. Die Chromosomen Nr. 13 bis 15 in der D-Gruppe zeigten ein ähnliches Segment-Muster, und es waren in jeder drei Segmente zu erkennen, obwohl die Frequenz nicht so hoch lag, wie diejenige in den Gruppen A, B und C.

Die kleineren Chromosomen, Nr. 16 bis 22 in den Gruppen E, F und G waren im allgemeinen durch die Morphologie der Segmentalmuster schwer zu erkennen, und zwar wahrscheinlich deshalb, weil sie durch die Kältebehandlung nicht soweit verändert werden konnten. Die Nummern 17, 18 und 22 zeigten kaum Spezialsegmente in den beiden homologen Teilen der langen Arme.

DISKUSSION

Die interessanteste Beobachtung bei der vorliegenden Forschungsarbeit ist diejenige, daß die mit Kälte behandelten Zellen klare Formen ihrer Chromosomen zeigen und stark gefärbte Segmente, die entlang dem Chromosom mit solchen Segmenten abwechseln, die fast gar keine Färbung aufweisen, und diese Abwechslung verläuft in regelmäßiger Sequenz.

Die Ähnlichkeit der Segmentalmuster zwischen homologen Chromosomen in derselben Zelle, zwischen denselben Paaren in verschiedenen Zellen desselben Materials kann durch deren Morphologie erkannt werden, besonders in den Chromosomen der Gruppen A, B, C und D. Diese Segmentalmuster bei Chromosomen, die mit niedriger Temperatur behandelt wurden, können deshalb zur Identifizierung als die Unterscheidungsmerkmale individueller Chromosomen benutzt werden. Ein solches Phänomen war bereits in pflanzlichen Chromosomen beobachtet worden und von Darlington und La Cour (1938) bezeichnet worden als Differential-Reaktivität in *Paris polyphylla*, *Trillium* und *Fritillaria* (Darlington und La Cour, 1940, 1941). Nach deren Interpretation hängt das Phänomen von der verringerten Produktion an Nukleinsäure (DNS) bei niedriger Temperatur ab, wobei die produzierte Nukleinsäure an die euchromatischen Segmente angehängt wird, welche eine stärkere Affinität zur Nukleinsäure haben, als das bei den heterochromatischen Segmenten der Fall ist. Diese Reaktion wurde die DNS-Aushungierung genannt (Darlington und La Cour, 1940). Hampel und Levan (1964) untersuchten eine epithel-ähnliche Zellenlinie, die sie aus einer menschlichen Embryo-Lange erhalten hatten, in der Hoffnung, daß die Reaktion der DNS-Aushungierung durch Kältebehandlung erreichbar wäre. Es gelang ihnen nicht, festzustellen, ob in ihrem Fall die Bruch-Zusammenziehungen irgendetwas mit DNS-Aushungierung zu tun hatten, da es ihnen auch nicht gelang, Regelmäßigkeiten im Muster der Zusammenziehungen zu entdecken. Immerhin kann das Phänomen als ähnlich mit dem der vorliegenden Untersuchung angesehen werden. Die vorliegende Studie hatte das Ergebnis, daß eine gewisse Regelmäßigkeit in den Mustern der Zusammenziehung gefunden wurde. Die beobachteten Zusammenziehungen scheinen die gleichen zu sein, wie die gesonderten Segmente, die sich bei der DNS-Aushungierung bildeten.

Ein Vergleich der Häufigkeit im Auftreten der Spezialsegmente und der Sekundär-Zusammenziehungen ist in Tabelle 4 angehängt. Wie in Tabelle 4 zu ersehen ist, war die Zahl der gesonderten Segmente, die bei der vorliegenden Studie beobach-

tet wurden, höher als die der sekundären Zusammenziehungen, worüber Veröffentlichungen anderer vorliegen; spontan (Ferguson-Smith und andere, 1962), oder durch Fixieren (Saksela und Moorhead, 1962) oder in einem kalziumfreien Medium (Sasaki und Makino, 1963) oder BUDR (Palmer und Funderburk, 1965) oder spontan in menschlichem Krebsstrang von RPMI 1650 (Miles und O'Neill, 1966). Die zahlreichen und prominenten gesonderten Segmente einschließlich der sekundären Zusammenziehungen waren sehr nützlich für die detaillierte Analyse der Kerntypen.

Schmid (1963), der die DNS-Replikationsmuster menschlicher Chromosome mit tritiumbehandeltem Thymidin ($C_{10}H_{14}N_2O_5$) studierte, fand kleine, spät zurückbiegende Regionen, welche den Sekundär-Zusammenziehungen zu entsprechen schienen, die von Saksela und Moorhead (1962) und von Sasaki und Makino (1963) beobachtet wurden. Von den oben erwähnten morphologischen Basen und Replikationsmustern wurden die Regionen sekundärer Zusammenziehungen zum großen Teil in menschlichen somatischen Chromosomen identifiziert, obwohl die Funktion aller dieser Gebiete immer noch nicht geklärt ist.

Eine weitere wichtige Beobachtung der vorliegenden Studie ist diejenige, daß ein besonderer Fortschritt bei der Identifizierung der C-Gruppe erreicht wurde. In der Kontrollkultur mag es manchmal schwierig sein, die Chromosomen Nr. 6, 7 und X voneinander zu unterscheiden. Das Chromosom Nr. 6' kann jedoch ausreichend durch das Vorhandensein hervorstechender gesonderter Segmente, induziert durch Behandlung mit niedriger Temperatur, identifiziert werden, so daß es leicht von den anderen Chromosomen der C-Gruppe unterscheidbar ist. Die einleitende Studie über das gleiche Material mit 3H -Thymidin-Kennzeichnung und Autoradiographie zeigten ebenfalls, daß eines der Chromosomen Nr. 6' später abgog als der Rest der komplementären Gegenstücke. Von dieser Warte aus gesehen,

kann somit das Chromosom Nr. 6 als das X-Chromosom interpretiert werden. Die Spezialsegmente an den spezifischen Stellen, die sich von den Sekundär-Zusammenziehungen unterscheiden, die bereits in menschlichen Chromosomen dargestellt wurden, mögen eine detaillierte Charakterisierung (Mikrokerntyp) des normalen menschlichen Idiogrammes zeigen. Die mit der vorliegenden Untersuchungsarbeit erzielten Resultate können verwendet werden für das Studium der Chromosom-Aberrationen, wie zum Beispiel Inversionen, Ausfälle, kleine Umgruppierungen und andere.

ZUSAMMENFASSUNG

Die vorliegende Studie wurde zu dem Zweck durchgeführt, um auf der Basis der Differential-Reaktivitäten menschlicher Leukozyt-Chromosomen, die mit niedriger Temperatur behandelt wurden, die Kerntypen detailliert zu bestimmen. Die behandelten Chromosomen zeigten deutlich viele prominente Spezialsegmente einschließlich sekundärer Zusammenziehungen, und diese Segmentalmuster ordeten sich in gleichmäßiger Reihenfolge entlang den einzelnen Chromosomen an.

Eine weitere wichtige Beobachtung ist die, daß das sogenannte X-Chromosom die spezifischen Segmentalmuster mit der höchsten Frequenz unter denjenigen der C-Gruppe trug. Es wird daher der Schluß gezogen, daß die Behandlung mit niedriger Temperatur sehr nützlich ist für die Unterscheidung individueller Chromosomen der menschlichen komplementären Gegenstücke.

2.11 GIEMSA -9- FÄRBUNG

Bei Routinefärbungen mit Orcein und Giemsa fanden Patil, Merrik und Lubs gelegentlich Bandenmuster. Systematische Studien über gewisse Veränderungen wurden unternommen, um eine Färbung zu entwickeln, die gleichmäßig Informationen

bringt. Zellkulturen wurden für 68 - 70 Stunden in vollständigem McCoy-s 5A Medium mit 15% fetalem Kalbsserum inkubiert, mit hypotoner KCl ($0,075 \text{ mol/l}$) behandelt, in einer Mischung von Athanol und Eisessig (3:1) fixiert, ausgebreitet und durch blasen luftgetrocknet. Einige Aspekte der Giemsa-Färbung wurden genau studiert. Der pH des Na_2HPO_4 -Puffers und der der Farbe wurde von pH 5,0-12,0 verändert, indem Zitronensäure oder NaOH hinzugefügt wurde. Dann werden 2ml Farbe und 2ml Puffer zu 96 ml Wasser gegeben. Der pH wurde mit Beckmann Zeromatic pH meter gemessen. Unter pH 9,0 wurde kein Bandenmuster gesehen; oberhalb pH 10,0 wurden offensichtlich Chromosomenschäden induziert, und es wurden weniger klare und beständige Bandenmuster erzielt. Auch die Färbungsdauer mit Giemsa pH 9,0 scheint wichtig zu sein. Wenn die Objektträger 1-2 min gefärbt wurden, wurden vorwiegend die Centromerregionen gefärbt; gelegentlich wurde auch Färbung der Sekundärstruktur von A1 und E16 beobachtet. Nach 4-6 min erschien ein reproduzierbares Bandenmuster, das dem gleicht, das bei der QM Fluoreszenz gefunden wurde, in Zwischenmetaphasezellen. Nach 15-30 min wurde eine einförmige Färbung beobachtet. Die Molarität des Puffers wurde von $0,03$ - $0,14 \text{ mol/l}$ verändert, der pH wurde auf 9,0 gehalten, die Giemsakonzentration blieb 2%; dadurch änderte sich jedoch nur die zur Färbung benötigte Zeit (5-30 min). Wurden die Objekte vor der 5 min Färbung bei pH 9,0 2-30 min im Puffer inkubiert, so änderte sich das Bandenmuster nicht.

Auf grund dieser Untersuchungen wurde folgende Methode ausgearbeitet: Die Objekte werden 5 min gefärbt, unter fließendem kalten Wasser abgewaschen und luftgetrocknet. Die Farbe besteht aus 2 ml Harleco Giemsa Blood Stain Azure A stock-solution (oder Giemsa Merck), 2ml $0,14 \text{ mol Na}_2\text{HPO}_4$ und 96ml H_2O . Diese Lösung wird, falls notwendig auf pH 9,0 gebracht.

Die Kontraktionsphase der Metaphasezellen ist teilweise interessant; sehr frühe Metaphasestadien zeigen ein diskretes Chromomerenmuster; in diesen Zellen ist die Identifizierung homologer Paare schwierig, ebenso bei Zellen in späten Metaphasen. In Mitte-Metaphasezellen können homologe Paare in der Mehrzahl identifiziert werden. Das Ganze wird Giemsa-9-Färbung genannt.

Auf diese Weise wurden 50 Zellen untersucht und nach Entfärbung mit 70% Äthanol auch mit der QM-Fluoreszenzmethode; zweifache Karyotypen wurden angefertigt. Die wichtigen Stellen zur Identifizierung der Homologen waren im allgemeinen bei beiden Methoden identisch, das wurde in der C-Gruppe besonders offensichtlich, wo dieselben Regionen keine Farbe zeigten. Einige Ausnahmen müssen jedoch bestätigt werden. Das distale Ende des langen Arms des Y-Chromosoms fluoresziert hell, aber mit Giemsa-9-Färbung zeigt es eine Abnahme der Farbdichte. Die paracentrischen Strukturen in den langen Armen von A1 und C9 zeigen nur eine geringfügige QM-Fluoreszenz; Giemsa-9 bringt dunkle Banden nahe den Centromeren beider Chromosomen hervor, und nur der distale Teil dieser Strukturen erscheint hell. Andere weniger ausgeprägte Unterschiede sollen nach dem Vergleich spezifischer Regionen in einer großen Anzahl von Zellen berichtet werden.

Die auffallende Ähnlichkeit der Bandenmuster, die mit Giemsa-9 und QM-Fluoreszenz erhalten werden, drängen den Gedanken auf, daß beide Färbungen in der selben Art und Weise wirken, obwohl in keinem Fall der Mechanismus bekannt ist. Da die Sekundärkonstruktionen mit beiden Methoden weniger gefärbt erscheinen, ist es möglich, daß die Intensität der Färbung auf unterschiedlichem DNS-Gehalt oder der Verfügbarkeit der DNS beruht. Regionen, die oft eine besonders helle Fluoreszenz zeigen, wie das Centromer von A3, die Satellitenregionen der D- und E-Gruppe und das distale Ende des langen Arms des Y-Chromosoms, können Ausnahmen sein, und die hellste Fluoreszenz könnte aus einer Wechselwirkung mit Guaninreichen Gebieten stammen.

2.12. DIFFERENZIERUNG EINZELNER CHROMOSOMEN

Craig-Holmes und Shaw fanden eine Anzahl von Variationen bei verschiedenen Individuen.

Histone wurden für 15 min mit 0,2n HCl, anschließend für 1 min mit 0,07n NaOH behandelt und für 24 Std bei 65°C in Salz-Citratlösung inkubiert. Zum Schluß wurden die Objektträger 15 min in gepufferter Giemsalösung gefärbt.

Analysen von 25 Zellen eines jeden der 5 Individuen zeigten Unterschiede unter den Chromosomenpaaren der Gruppen D, E und G. Diese Unterschiede waren jedoch oft so gering ausgeprägt, daß es schwer war spezifische Paare zu erkennen. Die Paare der Gruppen B, C und F ließen keine klare Entscheidung zu. Eine unerwartete Entdeckung war das Erscheinen einer großen Anzahl Heterochromatin-Polymorphismen innerhalb homologer Paare. Nur ein einziges Individuum zeigte in allen 46 Chromosomen "normale" Heterochromatinstreifen. Bei den 4 übrigen wurden 7 verschiedene Muster beobachtet, die die Chromosomen Nr. 1, 9 und 16 und die Gruppen D, F und G enthielten.

Ein Individuum hatte im Chromosom Nr. 9 einen Heterochromatinblock, der mindestens 2 x so lang war wie gewöhnlich. Die Heterochromatinregion des homologen Partners, der mit dieser Methode vollständig identifiziert wurde, sah normal aus. Bei einem zweiten Individuum zeigten sich zwei Varianten, nämlich in der Gruppe D einen ungewöhnlich großen Heterochromatinblock und ein Chromosom der Gruppe G, in dem keine Satelliten oder ihre Verbindungsstücke sichtbar waren. Obwohl die kurzen Arme bei dieser Methode gewöhnlich nicht dunkel gefärbt erscheinen, tendiert die Methode dazu, die Satelliten und ihre Verbindungen der akrozentrischen Chromosomen zu verlieren. Dies ist eine neue Erkenntnis über die Morphologie der kurzen Arme, und ein Verlust des Chromatins dieser Region ist leicht zu erkennen.

Jedes der beiden übrigen Individuen hatte 2 verschiedene Varianten. Einmal hatte das Chromosom Nr. 1 einen ungewöhnlich breiten Heterochromatinblock und im Chromosom Nr. 16 war die Heterochromatinregion auf nahezu $1/3$ ihres normalen Umfangs vermindert. Die letzte Person zeigte zwei weniger auffällige, dafür stets gleichbleibende Abweichungen. Ein F-Chromosom zeigte eine ausgeprägte Vermehrung des centromeren Heterochromatins, das sich bis in beide Arme erstreckte und ein G-Chromosom, in dem sehr auffällige Satelliten ungewöhnlich dunkel gefärbt waren. Normalerweise wurde keines dieser beiden Muster in der F oder G-Gruppe gesehen.

Jede dieser 7 Varianten wurde nur im heterocygoten Zustand, dann aber grundsätzlich in jeder untersuchten Zelle gesehen; wiederholte Kulturen derselben Personen sicherten die ursprünglichen Beobachtungen. Zusätzlich wurden von jeder der 5 Personen 10 Zellen kariotypiert, unbehandelte Präparate mit Aceto-Orceinfärbung. In keiner dieser Zellen konnte eine morphologische Variante festgestellt werden. Das bedeutet, daß es mit der herkömmlichen Zytologie unmöglich ist, Heterochromatinvarianten zu entdecken, die sich mit der Methode der De- und Renaturierung darstellen lassen.

Eine Zunahme der absoluten Länge begleitet die Heterochromatinvarianten der Chromosomen 1 und 9. Dieses könnte sowohl als unterschiedliche Aufspulung der Chromosomenvarianten, als auch als Zuwachs an Heterochromatin betrachtet werden. Letzteres scheint wahrscheinlicher, da es so aussieht, als ob die Gesamtmenge des Heterochromatins in allen Zellen zugenommen habe.

Die Natur des Heterochromatins ist schon beschrieben worden, biochemische Studien anderer Säugetiere haben aber gezeigt, daß das konstitutive Heterochromatin (in beiden Homologen eines Chromosomenpaares sichtbar) sich in erster Linie aus früh replizierender DNS zusammensetzt. Dasselbe gilt auch für Menschen, wie die in situ Hybridisierungsversuche andeuten, die zeigen, daß die früh replizierende DNS wenig-

stens teilweise in den Heterochromatinregionen zu finden ist. Deshalb bestehen wenig Zweifel, daß dem konstitutiven Heterochromatin, das nach der Denaturierung und Renaturierung sichtbar wird, eine spezifische Molekularstruktur zugrunde liegt. Dieses Material besteht aus Nucleotidsequenzen, die sich oft wiederholen, und das eine DNS darstellt, die sich von der einzelnen oder einfachen DNS-Kopie des Euchromatins unterscheidet.

Die sich wiederholende Struktur des Heterochromatins drängt den Gedanken an einen Mechanismus auf, der das Erscheinen der Polymorphismen erklären könnte. Die wahrscheinlichste Ursache dieser Heterochromatinvarianten ist ein ungleichmäßiges Crossingover der serienmäßig, replizierenden Sequenzen. Da einige Kombinationsmöglichkeiten für die Paare homologer Regionen innerhalb der Familien der replizierenden DNS verfügbar sind, so besteht in diesen Regionen ein größeres Risiko eines ungleichen Crossing-over. Z.B. könnte innerhalb einer Sequenz abcab die Paarung zwischen der Position 1 des einen Stranges und der Position 4 des komplementären Stranges erfolgen. Ein unvollständiger Wechsel würde dann zwei verschiedene Crossing-over Produkte ergeben, in diesem Falle abcabcab und abc. Daraus ergibt sich, daß um so mehr Varianten erwartet werden können, je öfter sich eine Einheit innerhalb einer Sequenz wiederholt; je länger die Sequenz ist, um so größer wird der Unterschied der entstehenden Crossing-over.

Die Bedeutung des konstitutiven Heterochromatins ist noch unbekannt. Möglicherweise sind in diesen Gebieten keine aktiven oder funktionellen Gene vorhanden. Trotzdem ist es schwierig, diese weit verbreitete DNS mit keiner genetischen Aktivität in Verbindung zu bringen. Mehrere mögliche Rollen der replizierenden DNS werden vermutet. Eine bisher noch nicht beachtete Funktion liegt darin, daß das centromere Heterochromatin den Kode für mikrotubuläre Formationen und Vereinigungen enthält. Dies scheint um so wahrscheinlicher, da Mikrotubuli an allen Centromeren von kleinen speziellen Elementen verein-

nigt werden, um die Chromosomenfasern des Spindelapparates zu bilden. Dazu paßt ebenfalls, das in den Centromeren aller Organismen, die bisher untersucht worden sind, konstitutives Heterochromatin vorkommt. Diese spezielle Funktion würde nicht für das Heterochromatin der Sekundärstruktur oder des langen Arms des Y-Chromosoms zutreffen und zweifellos müssen diesen Regionen andere Funktionen zugesprochen werden.

Der hier beschriebene Variationstyp muß vorläufig als seltenes Phänomen angesehen werden. Z.B. wurden Asymmetrien der Chromosomen Nr. 1, 9 und 16 und verschiedene Länge der Y-Chromosomen in Standardleukozytenpräparaten beobachtet, und diese sind gewöhnlich ererbt. Möglicherweise zeigen diese Abweichungen, die mit herkömmlichen Methoden entdeckt werden können, nur ein Ende des Spektrums der Heterochromatinpolymorphismen. Die Empfindlichkeit der Methode der Denaturierung und Renaturierung, Heterochromatinvarianten zu entdecken, führt zu der bedeutsamen Entdeckung, daß solche Abweichungen häufiger vorkommen, als bisher angenommen wurde. Zusätzliche Studien der Heterochromatinabweichungen in der Bevölkerung und in den Familien mögen entscheiden, wie groß die Toleranzbreite des Genoms für diese Abweichungen ist.

3. EIGENE UNTERSUCHUNGEN

Zunächst wurden verschiedene Möglichkeiten der Färbung und Vorbehandlung auf ihre praktische Anwendbarkeit geprüft. Dazu wurden die Vorschläge verschiedener Autoren ausprobiert.

3.1 Methode nach Schnedl

3.1a " " " Citratpuffer statt Phosphatpuffer

3.2 Einfache Giesafärbung bei pH 9,0

3.3 Methode nach Seabright

3.4 Abgeänderte Methode nach Sperling:

Herkömmliche, luftgetrocknete KCl-Präparate werden 20 min in 4 Teilen Phosphatpuffer, pH 7,0 und ein Teil Leishman (Merck) dem auf 500 ml der Farblösung 1 ml 0,25% Trypsin zugegeben wurde, gefärbt. Anschließend unter Leitungswasser gespült, luftgetrocknet und über Xylol in Eukitt eingebettet.

Methode	Anzahl der Probanden	davon erkennbare Bandenmuster	davon deutliche
1	40	8	2
10	5	1	./.
2	6	2	./.
3	7	./.	./.
4	52	12	3
Insgesamt:	110	23	5

Bei den eigenen Untersuchungen ließen sich also unabhängig von der angewandten Methode nur in 20% der Fälle erkennbare Bandenmuster entdecken.

4. KRITIK DER ERGEBNISSE

Mit den erhaltenen Ergebnissen war nun die experimentelle Seite dieser Arbeit im Rahmen des gestellten Themas beendet.

Die optimistische Meinung der anderen Autoren, kann aufgrund dieser Ergebnisse nicht geteilt werden. Im großen und ganzen gesehen scheint die Bandenfärbung zur Identifizierung einzelner Chromosomen des Menschen, gleichgültig, welche Methoden angewendet wurden, noch ein wenig in den Kinderschuhen zu stecken.

Möglicherweise brächte die ausschließliche Verwendung von KCl-Präparaten eine Verbesserung. Diese Meinung konnte durch eigene Untersuchungen aber nicht bestätigt werden. Außerdem scheint viel von der geglückten, vollständigen Ausbreitung der Chromosomen abzuhängen, die bei den vorliegenden Untersuchungen oft nicht gegeben war. Vielleicht lassen sich in dieser Hinsicht in Zukunft noch einige technische Verbesserungen erzielen, heutzutage sind die besten Präparate gerade noch brauchbar.

Trotzdem stimmt es nachdenklich, daß Präparate, die allem Anschein nach und allen bisherigen Erfahrungen zufolge, die besten Voraussetzungen für eine geglückte Bandenfärbung mitbringen, trotz ausgezeichneter Färbung nicht die geringste Andeutung von Bandenmustern erkennen lassen. Solche Vorkommnisse geben zu der Überlegung Anlaß, ob sich die Chromosomen aller Menschen zur Bandenfärbung eignen, oder ob in diesen Reaktionen schon genetische oder umweltbedingte Faktoren eine Rolle spielen.

5. DISKUSSION

In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob sich durch die Giemsa-Bandenfärbung einzelne Chromosomen des Menschen individuell, das heißt spezifisch, darstellen lassen.

110 Präparate von Kulturen männlicher und weiblicher Probanden wurden angefertigt und auf Banden untersucht. Dabei ergab sich, ungeachtet der angewendeten Methoden, 23 Proben mit erkennbaren Bandenmustern; davon waren 5 besonders deutlich. Es fanden sich also nur in etwa 20% aller Fälle Bandenmuster.

Der Grund dafür, daß alle Methoden nur so unregelmäßigen Erfolg bringen, kann an verschiedenen Stellen der Arbeitsgänge liegen. So stellt sich z.B. die Frage, ob nicht schon bei der Präparation, dem Zentrifugieren, dem Fixativ, der hypotonen Behandlung und dem Trocknen über der Flamme molekulare Strukturen geschädigt werden. Vielleicht würde eine hypotone Behandlung mit $0,075\text{mol KCl}$ eine Besserung der Ergebnisse bringen. Es könnte die Colcemid-Behandlung verkürzt werden oder eine schwächere Konzentration genommen werden. Vielleicht findet sich eines Tages ein schonenderes Fixativ als Methanol-Eisessig. Die Präparate scheinen etwas besser auszufallen, wenn sie nicht über der Flamme, sondern auf einer regulierbaren Heizplatte bei $35^{\circ} - 40^{\circ}\text{C}$ getrocknet werden. Bei der Methode nach Seabright ergaben sich Schwierigkeiten, die Präparate in waagrechter Lage gleichmäßig 10-15 sec zu spülen. Diese mangelhafte Geschicklichkeit erklärt wahrscheinlich auch das völlige Versagen in der Versuchsreihe (von 5 Präparaten keines verwertbar).

Die Trypsin-Leishman-Methode ist der einfachen Giemsa-Färbung gleichwertig. Die Trypsin-Konzentration von 0,005% läßt die Frage offen, ob das Trypsin überhaupt eine Wirkung hat. Möglicherweise gehen die Erfolge auf die niedrige Giemsa-Konzentration zurück. Dann wären die Banden durch präexistente Strukturen bedingt, die bisher durch zu starke Färbung überdeckt worden sind.

In Zukunft wird sicher auch die Entwicklung neuer Färbemethoden und Vorbehandlungen große Fortschritte machen.

Zum Abschluß wäre also festzustellen, daß die bisherigen Methoden der Bandenfärbung offensichtlich noch auf Schwierigkeiten stoßen, auch wenn andere Autoren von erstaunlichen Erfolgen berichten. Diese Methoden scheinen aber grundsätzlich eine große Zukunft zu haben. Sollten sich eines Tages alle Fehlerquellen und Hindernisse beseitigen und einige Absonderlichkeiten erklären lassen, so wären den genaueren Untersuchungen der Erbgänge beim Menschen neue Wege eröffnet.

Zusammenfassung

In dieser Abhandlung wird zunächst eine Übersicht über die Literatur über Chromosomenbande gegeben. Dabei handelt es sich vorwiegend um Versuche an tierischen Zellen. Die verschiedenen Färbemethoden und Ergebnisse werden hier geschildert. Anschließend wird über eigene Versuche an menschlichen Leukozyten berichtet.

Aus einem gemischten Patientengut standen 110 willkürlich ausgewählte Blutproben zur Verfügung. Es sollte geprüft werden, ob sich kennzeichnende Unterschiede in den Chromosomenbanden nachweisen lassen. Anamnese und eventuelle Vormedikation waren in keinem Fall bekannt, sodaß es sich nicht um eine auf den einzelnen Patienten bezogene Untersuchung handelte.

Die Anreicherung und Ausfällung der Leukozyten, sowie der Aufstrich der Kulturen auf die Objektträger erfolgte in herkömmlicher Weise. Angewendet wurden folgende Färbemethoden:

Giemsafärbung nach Schnedl, ebenfalls in einer Variation mit Citratpuffer, anstatt Phosphatpuffer; einfache Giemsafärbung bei pH 9,0; Methode nach Seabright; abgeänderte Methode nach Sperling. Unabhängig von der jeweils angewendeten Methode wurden in allen Mustern Chromosomen gefärbt. Mehr oder weniger deutliche Chromosomenbanden fanden sich in 20% der Probanden. Es wurden unterschiedliche Bandenmuster festgestellt. Deren nähere Untersuchung und Klassifikation konnte wegen des völligen Umbaus des Laboratoriums und allen sich daraus ergebenden Schwierigkeiten nicht mehr in Angriff genommen werden.

Es ist zu wünschen, daß bessere Färbemethoden und schonendere Vorbehandlungen gefunden werden.

6. LITERATURVERZEICHNIS

T. Caspersson, L. Zech, C. Johansson, E.J. Modest

Identification of human chromosomes by DNS-Binding of
fluorescent agents.

Chromosoma 30, 215-227, 1970

Hsu, Patak, Shafer

Induction of chromosomes crossbanding by treating cells
with chemical agents before fixation

Experimental Cell Research 79, 1973

W. Schnedl

Banding patterns of human chromosomes

Nature New Biology 233, 93-94, 1971

Drets und Shaw

Specific banding patterns of human chromosomes

Proc. Nat. Acad.Sci. USA 68 Nr. 9, 2073-2077, 1971

Yunis Jorge, J. Liliana Roldan, G. Walid, Yasmineh u. J.C. Lee

Staining of repetetive DNS in metaphase chromosomes

A.F. Zakharov, N.A. Egolina

Differential spiralisation along mammalian mitotic
chromosomes

Chromosoma 44, 15-23, 1973

Yukimasa Shiraishi

The differential reactivity of human peripheral
leucocyte chromosomes induced by low temperature

Jap. Journal of Genetics 45, 429-442, 1970

Sandritter, W.

Funktionsstrukturen des Zellkerns
Die Medizinische Welt, 21, 1-10, 1970

Seabright, Marina

A rapid banding technique for human chromosomes
The Lancet, Octobre 30, 971-972, 1971

Patil Shivenand R., Suzanne Merrick u. Herbert A. Lubs

Identification of each human chromosome with a modified
Giemsa stain
Science, Vol. 173, 821-822, 1971

Craig-Holmes Ann, P. u. Margery, W. Shaw

Polymorphism of human constitutive heterochromatin
Science. Vol. 174, 702-704, 1971

Caspersson Torbjorn, Albert de la Chapelle, Jim Schröder
und Lore Zech

Quinacrine fluorescence of metaphase chromosomes
Experimental Cell Research 72 (1972) 56-59

Lebenslauf

Am 15. Oktober 1947 wurde ich als Tochter des Dr. Ing. Adolf Loser und seiner Ehefrau Eugenie, geb. Maas in Köln geboren. Dort besuchte ich vier Jahre die Grundschule, anschließend 9 Jahre das Gymnasium der Ursulinen in Mannheim.

Es folgte das Medizinstudium in München, das ich im Dezember 1973 mit dem Staatsexamen abschloß.

Während dieser Zeit war ich als Farmulus an verschiedenen Krankenhäusern tätig.

Meine MA-Zeit leistete ich im Städtischen Krankenhaus Bobingen, dann im Krankenhaus Marienhaus Ludwigshafen ab.

Seit dem 1.1.1975 bin ich im Städtischen Krankenhaus Ludwigshafen auf der Anaesthesie-Abteilung als Assistenzärztin tätig.

